



Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré

Florence Dupasquier

► To cite this version:

Florence Dupasquier. Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10078 . tel-00830801

HAL Id: tel-00830801

<https://theses.hal.science/tel-00830801>

Submitted on 5 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 78-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

l'Université Claude Bernard Lyon 1

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

ECOLE DOCTORALE MATERIAUX DE LYON

soutenue publiquement le 13 mai 2011

par

Florence DUPASQUIER

**Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération *in vivo* du
tissu cutané après brûlures du troisième degré**

Directeur de thèse : Pr. Laurent DAVID

JURY : M. Redouane Borsali

M. Guy Magalon

M. Thierry Delair

M^{me} Diane Agay

M. Didier Pin

M. Claude Carozzo

Rapporteur

Rapporteur

Président

Examinatrice

Examineur

Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Ce travail s'est déroulé à l'Institut des Matériaux Polymères (UMR 5223) grâce à un financement de la Délégation Générale pour l'Armement. J'ai beaucoup appris durant cette thèse, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, et je remercie l'ensemble des personnels permanents et étudiants du laboratoire.

Je voudrais remercier plus particulièrement Laurent David, directeur de thèse, pour avoir encadré ce travail et partagé ses connaissances et son savoir faire. Je le remercie également pour sa confiance et son soutien jour après jour au cours de ces quatre dernières années. Sans lui ce travail n'aurait pas vu le jour, et je le remercie vivement de m'avoir encouragée comme il l'a fait.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, M. Guy Magalon, professeur à la faculté de médecine d'Aix Marseille et chef du service de chirurgie plastique et réparatrice de l'Hôpital de la Conception, ainsi que M. Redouane Borsali, directeur de recherches CNRS à l'Université Joseph Fourier de Grenoble et directeur du CERMAV, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et le temps qu'ils ont consacré à son évaluation.

Je remercie Thierry Delair, professeur de l'Université de Lyon, d'avoir accepté de participer au jury et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je remercie également Diane Agay, Vétérinaire en chef et directeur de recherches à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, pour son aide précieuse et le temps consacré aux expérimentations, ainsi qu'à la relecture de mon travail. Ses qualités humaines et son dynamisme à toute épreuve m'ont souvent aidée à rester motivée dans les moments les plus difficiles.

Je remercie Claude Carozzo et Didier Pin, docteurs vétérinaires et maîtres de conférences à l'Ecole Vétérinaire de Lyon, pour leur implication dans le projet de recherche et l'aide qu'ils m'ont apportée dans le dépouillement et la mise en forme des résultats. J'ai passé de très bons moments à leurs côtés, je les remercie pour leur sympathie et pour m'avoir fait partager leur expérience. Pour l'accueil et l'aide apportée, je remercie également l'ensemble du personnel de l'Ecole Vétérinaire de Lyon avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Je remercie le Dr Benoit Chevalier, chef du service de biologie médicale de l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes, pour sa contribution dans le cadre de l'étude bactériostatique réalisée dans son laboratoire.

Je remercie également Lucie Enjalran, pharmacienne, pour le travail réalisé dans le cadre de cette même étude bactériologique.

Je remercie Cyrille Rochas, directeur de recherches à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, pour sa collaboration au sein de l'ESRF.

Merci à mes amis pour m'avoir soutenue et n'avoir (presque !) jamais douté du fait que je terminerais un jour cette thèse... Il y a ceux qui l'ont vécu avant moi : Cécile, Sébastien, Aurélie, Pascale, Bruno, Arnaud, Virginie, Quentin le faisan du phare ouest, Vincent... et ceux dont le tour viendra prochainement : Christelle, Denis, Kévin, Ludovic, Julien... (courage !)

Merci aussi à tous les autres, qu'ils soient anciens camarades de classe, danseurs, cavaliers ou encore taekwondoïstes, parce qu'ils étaient là avant, pendant (et malgré !) la thèse. Merci plus particulièrement à tous ceux qui n'ont pas posé la question récurrente : « Mais quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ?! »

Merci à toi Pilou pour ton soutien et ton amitié d'hier et d'aujourd'hui.

Merci à toi Ludax pour tous les bons moments partagés, pour les journées ménages ou bricolages, pour les tchats qui n'en finissent jamais, pour les 235 000 textos échangés, pour les déjeuners au « B » et pour toutes les gifles que tu m'as (ou ne m'as pas) données(!) Ton amitié m'est très précieuse.

Merci à toi Flo pour m'avoir toujours renvoyé une image très positive de moi-même ! Notre amitié a été semée d'embûches mais j'espère bien ne plus perdre de vue ta petite tête de noisette !

Merci enfin à toi Oram, pour les moments de joie que nous partageons, et pour l'aide que tu m'apportes depuis notre rencontre. Je voudrais saluer le courage dont tu as fait preuve pour me supporter au quotidien ces derniers mois (!) et j'espère vivre encore de nombreuses belles aventures à tes côtés. Merci aussi pour ton enthousiasme à l'égard de mes travaux de recherches ;)

Enfin je voudrais remercier ma famille. La présence de mes parents et leurs encouragements ont toujours été pour moi l'essence de ce que je suis et de ce que je fais.

Je remercie ma mère qui tient aujourd'hui seule ce rôle, avec talent. Je voudrais lui témoigner ma gratitude pour l'éducation qu'elle m'a donnée et l'assurer de mon soutien et de mon amour, quelles que soient les épreuves que nous devrons traverser ensemble.

A la mémoire de mon père

Sommaire

<u>LISTE D'ACRONYMES</u>	1
<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	3
<u>CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	7
<i>1^{ère} partie : La peau</i>	9
1. Organisation du tissu cutané	9
1.1 Epiderme	10
1.2 Derme	17
1.3 Hypoderme	21
2. Cicatrisation cutanée	22
2.1 L'hémostase	22
2.2 La phase détersivo-inflammatoire	23
2.3 Phase proliférative – Formation du tissu de granulation et épithélialisation	23
2.4 Remodelage	25
2.5 Les facteurs défavorables à la cicatrisation	25
3. Un modèle de choix pour l'étude de la cicatrisation cutanée : le porc	27
3.1 Similitudes structurales des tissus cutanés humains et porcins	27
3.2 Similitudes des mécanismes cicatriciels humains et porcins	28
3.3 Cas de la modélisation d'une brûlure thermique chez le porc	29
3.4 L'expérimentation vétérinaire chez le porc : questions pratiques	30
<i>2^{ème} partie : Biomatériaux pour la cicatrisation des brûlures</i>	33
1. La brûlure et son diagnostic	34
1.1 La profondeur de la brûlure	35
1.2 La surface de la brûlure	35
1.3 Autres facteurs déterminant la gravité de la brûlure	36
2. Soins des brûlures	37
2.1 Les greffes cutanées	38
2.2 Pansements et biomatériaux	42
<i>3^{ème} partie : Le chitosane, un polymère de choix pour la cicatrisation cutanée</i>	53
1. Le chitosane : définition et structure	53
2. Propriétés biologiques du chitosane	54
2.1 Biocompatibilité	54
2.2 Biodégradabilité	55

2.3 Propriétés bactériologiques et fongistatiques	55
2.4 Propriétés bioactives	56
3. L'utilisation du chitosane sous forme d'hydrogel	59
3.1 Définition d'un hydrogel	59
3.2 Cas des hydrogels physiques de chitosane	59
3.3 Origine de l'activité biologique des hydrogels : concept de leurre des milieux biologiques	61

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (CHAPITRE 1)</u>	67
---	----

<u>CHAPITRE 2 : DEMARCHE EXPERIMENTALE ET PROTOCOLES</u>	81
--	----

1^{ère} partie : Elaboration des hydrogels de chitosane	85
1. Purification et stérilisation du chitosane	86
2. Procédé de fabrication des hydrogels bicouches	88
3. Evaluation des propriétés antibactériennes des hydrogels	90
3.1 Choix du milieu de culture	90
3.2 Préparation des broyats d'hydrogels	91
3.3 Choix des bactéries	92
3.3 Protocole mis en œuvre	93
2^{ème} partie : Etude à long terme de cicatrisation après brûlure profonde (E1)	96
1 Suivi clinique	99
2 Etude histologique des tissus	100
2.2 Protocole de préparation des lames histologiques	100
2.3 Choix des prélèvements à étudier	102
3. Etude des propriétés mécaniques des tissus	103
3.1 Test de traction <i>in vivo</i>	103
3.2 Test de traction <i>ex vivo</i>	105
3.3 Durométrie	106
3^{ème} partie : Scénario de la cicatrisation en présence de chitosane (E3)	107
4^{ème} partie : Etude de la nanostructure du tissu cutané	108
1. 1 ^{ère} approche : microscopie électronique en transmission (TEM)	109
1.1 Protocole de fixation	109
1.2 Inclusion en résine	109
1.3 Contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb	110
2. 2 ^{ème} approche : diffusion des rayons X aux petits angles	111

2.1 Etude de faisabilité	112
2.2 Caractérisation des tissus prélevés lors de l'expérimentation E1	114
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (CHAPITRE 2)</u>	119
<u>CHAPITRE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	123
1^{ère} partie : Propriétés antibactériennes des hydrogels physiques de chitosane	125
1. Lecture des résultats	125
2. Cinétique de croissance bactérienne	126
2.1 Résultats obtenus pour <i>Escherichia coli</i>	129
2.2 Résultats obtenus pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	131
2.3 Résultats obtenus pour <i>Staphylococcus aureus</i>	133
2.3 Résultats obtenus pour <i>Enterococcus faecalis</i>	135
3. Discussion et interprétation	137
4. Conclusion	141
2^{ème} partie : Etude à long terme de la cicatrisation de brûlures en présence d'hydrogels physiques de chitosane	143
Multilayered physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third degree burns. Long term evaluation of the scar quality	145
3^{ème} partie : Scénario biologique de la cicatrisation cutanée en présence d'hydrogels physiques de chitosane	175
Multilayered physical hydrogels of chitosan for skin regeneration. Short term evaluation of cellular colonization after deep surgical wound.	177
4^{ème} partie : Etude nano-structurale du tissu cutané	193
1. Résultats de l'étude de faisabilité	194
2. Etude de la structure du tissu cutané après un an de cicatrisation dans le cadre de l'expérimentation (E1)	205
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (CHAPITRE 3)</u>	213
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	217

Liste d'acronymes

BCPH	Bilayered Chitosan Physical Hydrogel
DA	Degré d'acétylation : proportion d'unités acétylées.
EGF	Epidermal Growth Factor : hormone protéique provoquant une activité mitotique au sein des tissus ciblés
ESRF	European Synchrotron x-Rays Facilities (Grenoble)
FGF	Fibroblast Growth Factor : protéines sécrétées par les fibroblastes et qui activent la multiplication et la migration de cellules cibles.
GAG	Glycosaminoglycanes : Macromolécules linéaires constituées de la répétition d'un même motif disaccharidique sulfaté.
IgE	Immunoglobuline E : classe d'anticorps capable de déclencher des réactions allergiques immunitaires
IGF	Insulin-like Growth Factor : hormone peptidique dont la structure est semblable à celle de l'insuline.
IL1	Interleukine 1 : cytokine sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques. Elle joue un rôle dans les réponses inflammatoires face aux infections.
KGF	Keratinocyte Growth Factor : il est produit par les fibroblastes du derme et stimule la multiplication des cellules basales de l'épiderme et leur différenciation en kératinocytes.
MEC	Matrice extracellulaire : désigne l'ensemble des macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif et des autres tissus. Elle est principalement constituée de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes.
PMN	Polymorphonucléaire : cellule inflammatoire
PDGF	Platelet Derived Growth Factor : sécrété par les plaquettes, il stimule la croissance et la multiplication des cellules mésenchymateuses, jouant un rôle important dans la cicatrisation et dans l'angiogénèse.
SAXS	Small Angle X-rays Scattering (Diffusion des rayons X aux petits angles)
TEM	Transmission Electronic Microscopy

TGF- α	Transforming Growth Factor α : cytokine polypeptidique favorisant le développement cellulaire et produite par les <u>macrophages</u> , les <u>neurones</u> et les kératinocytes.
TGF- β	Transforming Growth Factor β : cytokine polypeptidique qui agit comme élément anti-rejet, présent sous trois formes (1,2,3)
TNF α	Tumor Necrosis Factor α : cytokine impliquée dans l'inflammation systémique.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor: protéine favorisant l'angiogénèse.

Introduction Générale

Chaque année on enregistre en France environ 400 000 cas de brûlures nécessitant des soins médicaux, parmi lesquels 10 000 entraînent une hospitalisation, dont le tiers a lieu en centre de traitement spécialisé (source : Direction Générale de l'Offre de Soins).

Dans le contexte militaire, le nombre de blessures par brûlures est non négligeable du fait de la mécanisation accrue des forces, de la précarité des conditions d'intervention lors des opérations extérieures et de l'utilisation de plus en plus fréquente d'engins explosifs improvisés (IED) par les forces terroristes. Les brûlures constituent 5 à 20 % des blessures et concernent environ 4 % des victimes. Bien que cette proportion puisse paraître faible, la prise en charge des blessés et les soins spécialisés qui leur sont dispensés consomment une quantité disproportionnée de ressources médicales, à la fois matérielles et humaines. A ces facteurs de risques s'ajoute l'exposition professionnelle des militaires pompiers de la Brigade des Sapeurs-Pompiers de Paris et de la Brigade des Marins-Pompiers de Marseille.

Que ce soit d'un point de vue civil ou militaire, le traitement des brûlures représente une préoccupation majeure pour l'équipe médicale qui doit traiter le patient brûlé, pour assurer sa survie dans un premier temps, puis limiter les séquelles cutanées invalidantes d'un point de vue fonctionnel et/ou esthétique.

Les techniques de greffes cutanées montrent des limites : interventions chirurgicales lourdes, génération de cicatrices secondaires au niveau des zones de prélèvements, et dans certains cas insuffisance du nombre de ces cites. Ainsi de plus en plus les recherches s'orientent vers l'ingénierie tissulaire dans le but de développer une « peau artificielle » idéale, c'est-à-dire :

- capable de rétablir la barrière cutanée
- fonctionnelle
- esthétique
- disponible en grande quantité et sans délai
- immunologiquement tolérée

Dans cette perspective, et selon les critères précités, l'objet de notre travail est d'évaluer l'intérêt biologique d'hydrogels physiques de chitosane pour la régénération *in vivo* du tissu cutané, après une brûlure profonde. Le dispositif étudié est un hydrogel physique bicouche de chitosane élaboré au laboratoire. Ce dispositif a déjà montré des propriétés cicatrisantes intéressantes au cours d'une étude préliminaire, menée dans le cadre de la thèse de Nadège Vizio-Boucard. Ce travail a permis d'établir que les hydrogels de chitosane sont bien tolérés par l'organisme et qu'ils permettent la reconstruction de toutes les strates cutanées ainsi que celle du réseau vasculaire. L'évaluation clinique des cicatrices a amené les auteurs à considérer que les hydrogels physiques de chitosane favorisent la génération d'un tissu plus souple, ainsi ils suggèrent une étude des propriétés mécaniques plus rigoureuse, et s'interrogent sur l'évolution de ces mêmes propriétés à plus long terme. L'étude des dispositifs cicatrisants présenté dans ce travail préfigure également d'autres systèmes plus complexes pour la régénération cutanée, éventuellement cellularisés, ou contenant divers principes actifs. En effet, les hydrogels physiques peuvent jouer le rôle de bioréacteurs (*in vitro*), et peuvent encapsuler des médicaments en jouant le rôle d'un système de délivrance retardé (*in vivo*).

Le présent travail concerne tout d'abord l'étude du tissu régénéré à long terme d'un point de vue fonctionnel, esthétique, structural et mécanique. Par ailleurs nous nous sommes intéressés aux mécanismes biologiques mis en œuvre au cours de la cicatrisation en présence des hydrogels physiques de chitosane, ainsi qu'aux propriétés antibactériennes de ces mêmes hydrogels.

Ce manuscrit comporte une première partie bibliographique divisée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'organisation du tissu cutané et à la description des différentes étapes de cicatrisation. Le second chapitre est consacré aux brûlures, et aux différentes options thérapeutiques disponibles à ce jour. Enfin le troisième chapitre est consacré au chitosane et à l'intérêt de son utilisation pour cette application, en particulier sous forme d'hydrogel.

La deuxième partie du manuscrit regroupe les différents protocoles et techniques expérimentales mis en œuvre au cours de la thèse. Le premier chapitre concerne l'élaboration des hydrogels et l'étude de leurs propriétés antibactériennes. Les deuxième et troisième chapitres rapportent les détails des protocoles d'expérimentation animale qui ont permis d'évaluer la cicatrisation à long terme d'une part, et d'étudier les mécanismes

biologiques d'action du chitosane d'autre part. Enfin le dernier chapitre rassemble les matériels et méthodes utilisés pour caractériser les tissus d'un point de vue structural.

La dernière partie du mémoire est consacrée aux résultats expérimentaux, retranscrits dans 4 chapitres concernant : les propriétés antibactériennes des hydrogels de chitosane ; l'évaluation de leur intérêt thérapeutique à long terme en terme de fonctionnalité des néotissus et de leurs propriétés mécaniques ; le mode d'action biologique des hydrogels de chitosane et la nature de leurs interactions avec le milieu vivant ; et enfin l'étude structurale de l'organisation du tissu cutané. Ces résultats sont présentés pour certains sous forme de publications qui seront prochainement soumises.

Chapitre 1 : étude bibliographique

1^{ère} partie : La peau

La peau humaine est un organe complexe essentiel à la protection de l'organisme, qui assure une protection face aux agressions physiques, mécaniques, chimiques et biologiques de l'environnement, mais qui participe aussi à la définition psychologique de l'individu. Avec ses 2m² et ses 5 kg en moyenne, la peau constitue l'organe le plus important volumineux du corps humain. Outre ses propriétés barrière (mécanique, thermique, chimique, bactérienne), elle assure une variété d'autres fonctions comme la réception de messages thermiques et sensoriels, permet la dissipation de la chaleur, et régule les pertes hydriques, assure un stockage des graisses. Nous rappellerons brièvement dans ce chapitre les structures qui permettent à la peau de remplir ces diverses fonctions.

1. Organisation du tissu cutané

Chez l'adulte, la peau mesure de un à une dizaine de millimètre d'épaisseur, selon l'individu et la partie du corps observée. Elle est formée de différentes couches superposées de la surface vers la profondeur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. A ces trois types tissulaires s'ajoutent des structures annexes, les follicules pilo-sébacés et les glandes sudoripares.

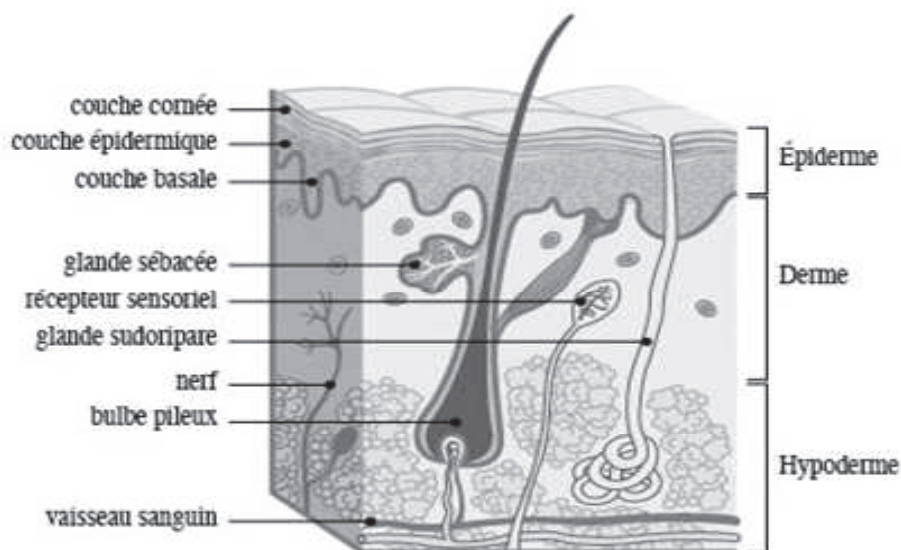


Figure 1 : schéma de la peau en coupe transverse

1.1 Epiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux, c'est à dire un tissu qui repose sur une lame basale et dont les cellules, polyédriques et jointives, donnent l'impression d'un pavage. Il est non vascularisé, mais richement innervé. Les cellules qui le constituent sont de quatre types : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.



Figure 2 : schéma de l'épiderme.

1 : kératinocyte, 2 : mélanocyte, 3 : cellule de Langerhans, 4 : cellule de Merkel. (d'après [1])

Les kératinocytes

Ce sont les cellules les plus abondantes dans l'épiderme (environ 80%), elles tirent leur nom des protéines qu'elles produisent, les kératines, et qui constituent une enveloppe cornée très résistante. On distingue deux types de kératines chez les mammifères : les kératines épithéliales ou cytokératines, et les kératines qui forment les poils et cheveux, appelées exokératines.

Les kératinocytes sont organisés en quatre strates qui sont, de la profondeur vers la surface :

- La couche basale (*Stratum germinativum*) : les cellules qui composent cette couche sont cubiques et reposent sur une lame basale à laquelle elles sont reliées par des hémidesmosomes qui contribuent à la solidité mécanique du tissu. La couche basale assure la nutrition de l'épiderme ; en effet les cellules qui la constituent sont des cellules actives sécrétrices (réticulum endoplasmique granuleux volumineux, appareil de Golgi développé, nombreuses mitochondries). La couche basale est le siège de fréquentes mitoses qui garantissent la production constante de kératinocytes. Les kératinocytes poursuivent alors leur différenciation au cours de la migration vers les

couches supérieures et subissent alors des modifications morphologiques et biochimiques.

- La couche épineuse (*Stratum spinosum* ou corps muqueux) : cette couche est constituée de cellules de grande taille, polyédriques, issues des divisions cellulaires de la couche basale et liées entre elles par des desmosomes. Sur ces desmosomes s'insèrent des tonofibrilles (agrégation de cytokératines produites par les kératinocytes)
- La couche granuleuse (*Stratum granulosum*) : les kératinocytes sont plus aplatis et perdent leurs organites. Le noyau se fragmente et le cytoplasme se charge en granules de kératohyaline, ces granules contiennent la profilagrine, qui après déphosphorylation servira au niveau de la couche cornée à agglutiner les fibres de cytokératine.
- La couche cornée (*Stratum corneum*) : les cellules anucléées très aplaties forment un assemblage très cohésif, leur cytoplasme n'est constitué que de kératine. Cette couche imperméable assure la fonction de barrière cutanée. L'épaisseur de cette couche peut atteindre plusieurs millimètres dans les zones de frottement. Les cellules les plus externes desquament sous l'action d'enzymes protéolytiques.

Le processus de kératinisation dure environ 28 jours, de la cellule basale à la desquamation cornée. Le renouvellement cellulaire est constant, assuré par des mitoses continues au niveau de la couche basale.

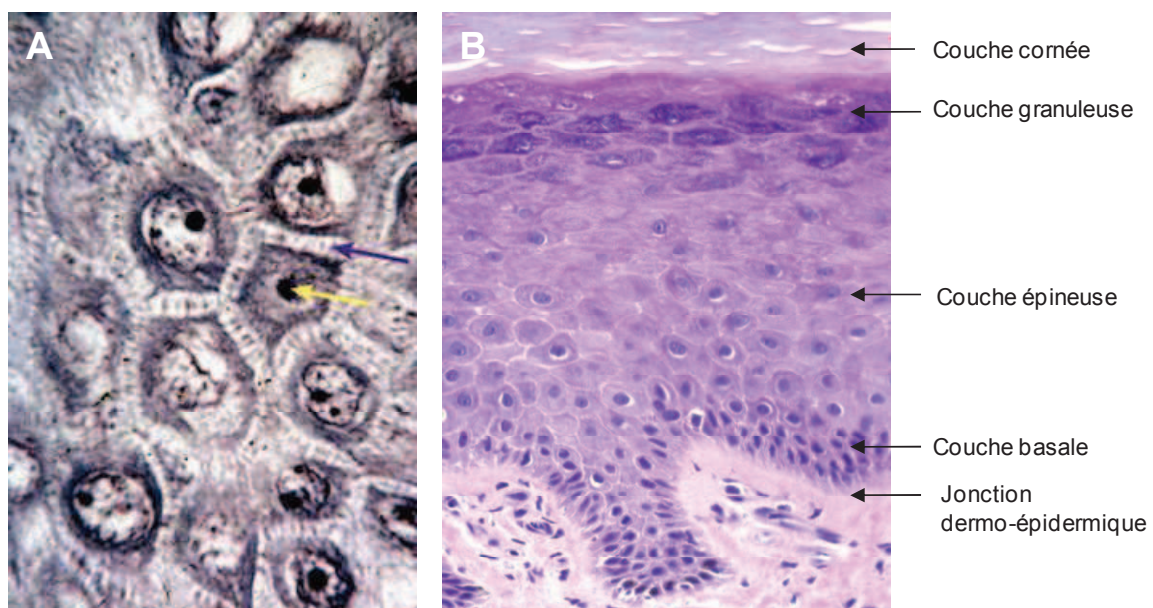


Figure 3 : Epiderme

A : microscopie électronique. Flèche jaune : noyau d'un kératinocyte, flèche bleue : pont intercellulaire (correspondant à l'emplacement des desmosomes)
B : microscopie optique, coloration HE. (d'après [1])

En immunohistochimie, les cytokératines peuvent être mises en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps anti-cytokératine AE1/AE3.

Les mélanocytes [2]

Ces cellules, responsables de la pigmentation cutanée, sont localisées dans la couche épineuse et la couche basale. De forme étoilée, leurs dendrites s'insinuent entre les kératinocytes. Grâce à ces dendrites, la mélanine produite par les mélanocytes est transférée aux kératinocytes qui l'utilisent pour lutter contre les UV en protégeant notamment le noyau cellulaire. La couleur de la peau ne dépend pas de la densité en mélanocytes qui est la même chez tous les individus, pour une zone donnée ; c'est la taille des vésicules de mélanine et leur mode de capture par les kératinocytes qui va déterminer le phototype de la peau. La mise en évidence des mélanocytes par immunohistochimie est possible par l'utilisation d'anticorps comme l'antiprotéine S100 (très sensible mais peu spécifique), l'anticorps HMB 45 (très spécifique, mais peu sensible).

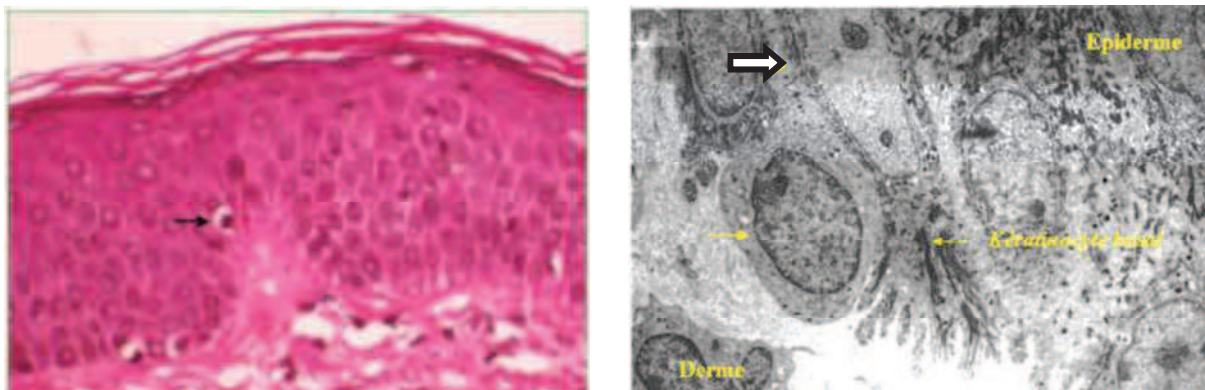


Figure 4 : en microscopie optique (A), après fixation et colorations standards, les mélanocytes (→) apparaissent comme des cellules arrondies, claires, à noyau rond et dense, situées entre les kératinocytes basaux et faisant parfois saillie dans le derme.

En microscopie électronique (B), on observe des prolongements qui s'insinuent entre les kératinocytes basaux (⇔). (d'après [1])

Les cellules de Langerhans [3-7]

Il s'agit de cellules dendritiques visibles à la surface de l'épiderme qui jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Leur fonction est d'informer en permanence l'organisme de son environnement chimique et en particulier antigénique. Lors de la pénétration d'une substance antigénique étrangère, les cellules de Langerhans capturent cette molécule, la

transforment et migrent par la voie lymphatique jusqu'aux ganglions proximaux où, dans les zones lymphocytaires T, elles coopèrent avec les lymphocytes CD4 et induisent soit une situation de tolérance, soit une situation d'hypersensibilité. Le dialogue entre la cellule de Langerhans au niveau des ganglions et les lymphocytes T CD4 passe par diverses reconnaissances moléculaires et en particulier, la reconnaissance par les récepteurs des lymphocytes T de la molécule antigénique présentée. La cellule de Langerhans, modèle des cellules dendritiques humaines, a donc pour fonction essentielle de stimuler les lymphocytes T naïfs par présentation d'antigènes avec lesquels l'organisme n'avait jamais été jusque là en contact. Cette réponse immunologique, dite réponse primaire, est toujours le fait des cellules dendritiques. Les macrophages ne sont pas capables d'induire une réponse primaire mais interviennent dans les réponses dites secondaires.

Les cellules de Langerhans se différencient des mélanocytes par l'absence de mélanosomes (présents dans le cytoplasme des mélanocytes). Elles se caractérisent par un appareil de Golgi très développé et surtout les granules de Birbeck en « raquettes » qui leur sont spécifiques. Les cellules de Langerhans de l'épiderme possèdent des marqueurs spécifiques : le skin homing antigen CLA (lymphocyte-associated antigen), la ϵ -cadhérine et la langerine (associée aux granules de Birbeck). Elles expriment d'autres marqueurs membranaires comme les molécules de classe II (et I) du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), la molécule CD1a, la molécule CD4 et la protéine S100.

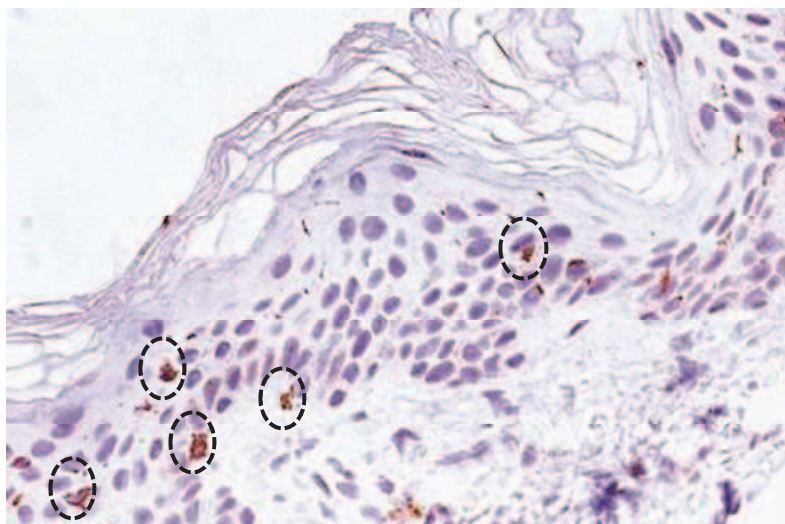


Figure 5 : cellules de Langerhans mises en évidence grâce au marqueur anti-CD1a, microscopie optique (d'après[1])

Les cellules de Merkel [8]

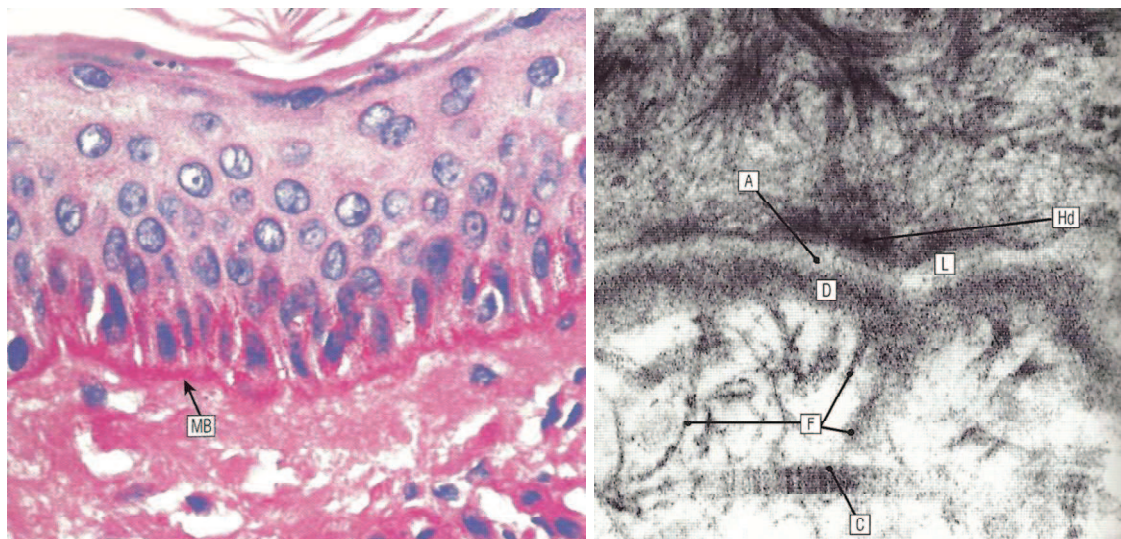
Ce sont des cellules cylindriques dispersées dans la couche basale. Leur cytoplasme est peu abondant, il renferme des vésicules neuroendocrines. Ces cellules sont des mécanorécepteurs, plus nombreux à certaines localisations (doigts, lèvres...), couplés aux terminaisons sensorielles libres intraépidermiques ou intrapapillaires.

Membrane basale – jonction dermo-épidermique [9]

Synthétisée par les kératinocytes basaux, la membrane basale joue un rôle essentiel pour la solidité mécanique et la nutrition de l'épiderme qui n'est pas vascularisé. Elle est constituée d'une armature protéique organisée en plusieurs strates :

- Superficielle : filaments d'ancrage (collagène XVII, plectine, laminines)
- Moyenne : GAG et collagène IV de la lamina densa
- Profonde : fibrilles et fibres d'ancrage, surtout constituées de collagène VII

La jonction dermo-épidermique est facilement identifiable sur les coupes histologiques grâce à son aspect « tortueux » lié à l'alternance de « crêtes » et de « papilles ».



*Figure 6 : Jonction dermo-épidermique. A gauche : microscopie optique, la membrane basale (MB) est mise en évidence par coloration au PAS (periodic acid-Shiff). A droite : microscopie électronique en transmission, La lame basale apparaît constituée de trois couches principales : la Lamina lucida (L), claire aux électrons, la Lamina densa(D), dense aux électrons, et la couche fibroréticulaire, mal définie. Les cellules basales sont attachées par des hémidesmosomes (Hd) à la lamina densa, à partir de laquelle des protéines d'ancrage (A) traversent la Lamina lucida. Côté derme, de fines fibrilles de collagène VII (F) lient la lamina densa aux fibres de collagène (C) du derme.
(d'après [10])*

En immuno-histochimie, la membrane basale peut être observée grâce au marquage du collagène IV, ou après coloration par le PAS (Periodic acid-Schiff).

Annexes épidermiques

Follicules pilo-sébacés :

Ils comprennent le poil et ses gaines, le muscle arrecteur du poil, et la glande sébacée.

On distingue :

- L'isthme, zone où les glandes sébacées se rejoignent ;
- Le bulbe, renflement situé en dessous du muscle arrecteur, source des cellules souches du poil.
- La région sus-isthmique, qui comprend la tige et l'infundibulum, cavité perforant l'épiderme, bordées par un épithélium de même nature que l'épiderme de surface. La tige du poil présente une moelle interne, un cortex externe (kératine dense) et une cuticule superficielle (simple couche de cellules kératinisées aplaties).
- La région sous-isthmique, comprenant la racine du poil et ses gaines épithéliales (externe et interne).

Il existe trois types de follicules :

- Les follicules « terminaux », profondément implantés jusqu'à l'hypoderme. Ils présentent des poils raides épais et longs occupant toute la largeur de l'infundibulum.
- Les follicules « lanugineux » ou « velus », responsables du duvet chez la femme, et des poils plus épais chez l'homme. Ce sont les principaux producteurs de sébum de la peau.
- Les follicules « sébacés », présentant des glandes sébacées larges et nombreuses. L'infundibulum est rempli d'un mélange de sébum, de lamelles cornées et de bactéries, autour d'un petit poil insignifiant.

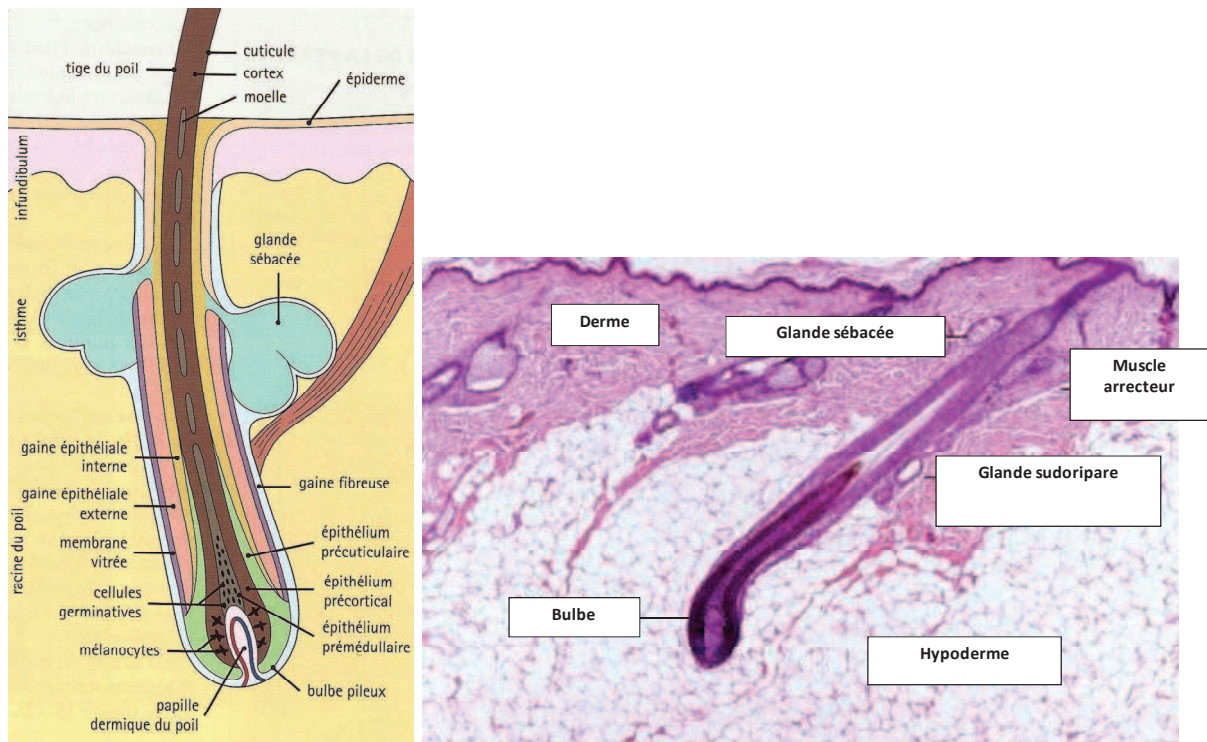


Figure 7 : Schéma d'organisation générale du follicule pilo-sébacé (à gauche) ; Coupe longitudinale, d'un follicule pilo-sébacé, microscopie optique, coloration HE (à droite). (d'après[10])

Les glandes sudorales ou sudoripares [11]

Chez l'homme on distingue deux types de glandes sudorales qui se différencient par la composition de la sueur qu'elles sécrètent.

- Les glandes sudorales eccrines se localisent sur presque tout le corps. Elles jouent un rôle important dans l'abaissement de la température corporelle, particulièrement en cas d'effort physique ou de fièvre. La sueur produite est composée d'eau et d'électrolytes (principalement NaCl, et dans une moindre mesure les ions calcium, potassium et magnésium). La sueur contient également de l'acide lactique, de l'ammoniaque et diverses protéines parmi lesquels des antigènes et des anticorps.
- Les glandes sudorales apocrines sont localisées principalement au niveau des zones axillaires et génitales, et toujours annexées à un follicule pilo-sébacé. Elles deviennent fonctionnelles à la puberté. La sueur apocrine est riche en lactates et en ions (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , HCO_3^-), elle est le vecteur de phéromones, et il a été mis en évidence qu'elle sert à la reconnaissance sexuelle olfactive, du moins chez l'animal.

1.2 Derme

Le derme est un tissu conjonctif fibreux traversé en plus par de nombreux vaisseaux et fibres nerveuses. Il est essentiellement constitué d'une matrice extracellulaire (MEC) dense dans laquelle baignent les cellules.

On distingue le derme superficiel dit « papillaire », du derme « réticulé », profond.

Le derme papillaire est riche en cellules, très vascularisé et constitué de fibres de collagène organisées en fins faisceaux. Il s'agit de collagène de type I et de type III, synthétisé par les fibroblastes. On trouve également dans le derme papillaire des fibres élastiques, fines, organisées perpendiculairement à l'épiderme.

Le derme réticulaire présente des fibres plus épaisses, uniquement constitués de collagène de type I, et organisées en gros faisceaux parallèles à l'épiderme. Les fibres élastiques sont elles aussi plus épaisses, et orientés parallèlement à l'épiderme.

La matrice extracellulaire

Comme dans les autres tissus conjonctifs, la MEC du derme est un réseau complexe de macromolécules, parmi lesquelles on distingue :

- les collagènes
- l'élastine
- les glycoprotéines
- les protéoglycanes et glycosaminoglycanes

Ces macromolécules représentent 30% de la masse du tissu cutané, tandis que les 70% restants sont constitués d'eau.

Les collagènes

Le collagène est la protéine la plus abondante de l'organisme, on en a répertorié à ce jour plus de vingt types différents, selon la localisation (tendon, cartilage, os, derme...). Le collagène est une protéine structurale qui joue principalement un rôle mécanique de renfort dans les tissus.

Majoritairement de type I et III dans le derme, on observe également du collagène de type IV au niveau de la jonction dermo-épidermique et des membranes basales entourant les annexes épidermiques et les structures vasculaires, musculaires et nerveuses.

Le collagène est synthétisé par les fibroblastes, d'abord dans leur cytoplasme sous forme d'un enroulement de trois chaînes α d'acides aminés stabilisé par des liaisons hydrogènes ; on parle de tropocollagène.

Dans la MEC, le tropocollagène s'organise en fibrilles minces associées à la fibronectine pour former des fibres de réticuline. Les fibrilles de collagène s'associent en structures plus importantes pour former les fibres de collagène. Ces fibres s'organisent à leur tour en faisceaux de diamètres de 0.5 à 40 μ m, les plus fins étant localisés dans le derme papillaire, et les plus gros dans le derme réticulaire.

La microscopie électronique montre que les fibres de collagène ont un diamètre moyen de 50nm, et présentent toutes une striation transversale périodique de 64 à 67nm.

Les fibres de réticuline localisée au niveau de la jonction dermo-épidermique et des lames basales des vaisseaux et des nerfs correspondent à des fibres isolées de collagène III.

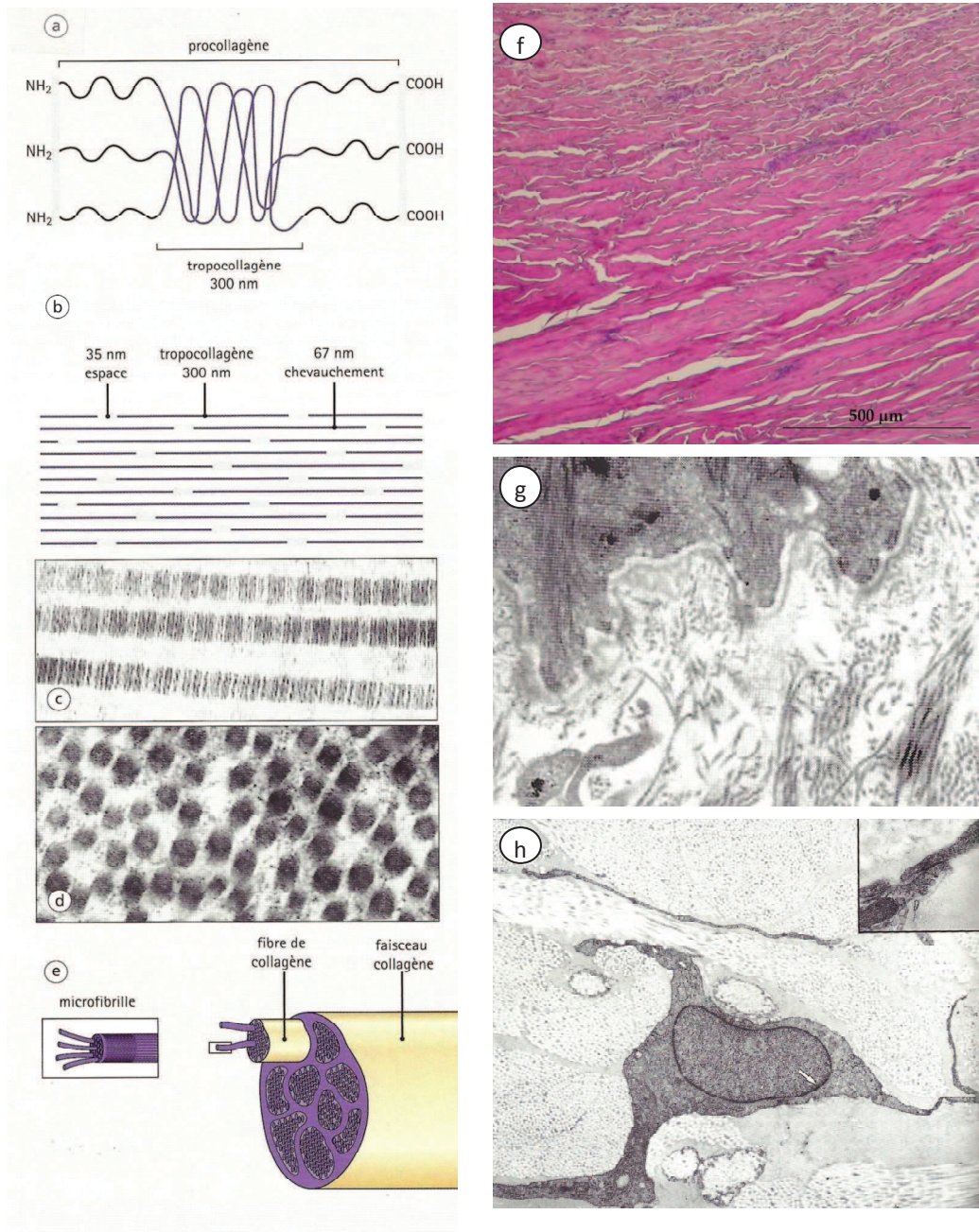


Figure 8 : (a) Le collagène est formé de trois chaînes polypeptidiques α qui s'associent en triple hélices ; (b) Le clivage des résidus terminaux carboxyliques et aminés permet l'alignement des molécules de tropocollagène pour former des microfibrilles ; (c) Chaque molécule de tropocollagène mesure 300nm de long et s'associe aux autres avec un décalage de 67nm, responsable de la striation visible en microscopie électronique ; (d) Coupe transversale du collagène en microscopie électronique ; (e) Les microfibrilles s'associent en fibrilles qui elle-mêmes s'associent en fibres par des liaisons latérales ; (f) faisceaux de fibres de collagène colorées par HE ; (g) jonction dermo-épidermique et fibres de collagène du derme papillaire en microscopie électronique en transmission ; (h) un fibroblaste en microscopie électronique en transmission. (d'après [10,12])

Populations cellulaires du derme

Les fibroblastes

Ce sont des cellules fusiformes présentant des prolongements cytoplasmiques parfois ramifiés. Ils sont spécialisés dans la synthèse (et la dégradation) des composants de la

matrice extracellulaire. Ils assurent la biosynthèse des fibres du derme. En culture et lors des phénomènes de cicatrisation, les fibroblastes s'activent et acquièrent un phénotype différent : on parle de myofibroblastes. Ces derniers présentent des microfilaments d'actine α -musculaire lisse, et jouent donc un rôle prépondérant dans la contraction des plaies.

Les dendrocytes dermiques

Ce sont des cellules mésenchymateuses dendritiques qui pourraient agir comme des macrophages dermiques ou des cellules présentatrices d'antigène [13]. On les trouve notamment dans les régions péri-vasculaires.

Les mastocytes

Ce sont des cellules mononuclées qui se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs chimiques comme la sérotonine, l'histamine, les prostaglandines, la tryptase, l'héparine. On trouve les mastocytes principalement dans les tissus conjonctifs, mais tous les organes en contiennent dans des proportions variables. La peau en est l'organe le plus riche.

Les mastocytes produisent donc de nombreux médiateurs qui jouent un rôle dans des processus variés: hypersensibilité immédiate, réaction inflammatoire, défense vis-à-vis de certains parasites, processus de cicatrisation, fibrose, etc... Ces médiateurs sont responsables de phénomènes allergiques.

Enfin les mastocytes interviendraient également dans les réactions d'hypersensibilité retardée, et pourraient jouer un rôle important dans la pathogénie des rejets d'allogreffes et dans de nombreuses maladies inflammatoires de localisations diverses.

En plus des cellules résidentes du derme, on peut observer des cellules « migrantes » provenant du sang (monocytes, polynucléaires, ...) en fonction du stress et des phénomènes d'inflammation.

Vascularisation cutanée

Le réseau de vascularisation se divise en trois plexus :

- Le plexus profond est le plus important. Les vaisseaux qui le constituent proviennent du tissu conjonctif sous cutané et cheminent dans le derme profond où il irrigue les bulbes et follicules pileux avant de rejoindre le derme moyen.

- Le plexus moyen, responsable de l'irrigation des glandes annexes
- Le plexus superficiel permet l'irrigation de l'épiderme, il se situe dans la partie très superficielle du derme et intervient dans le rôle d'isolant thermique de la peau.

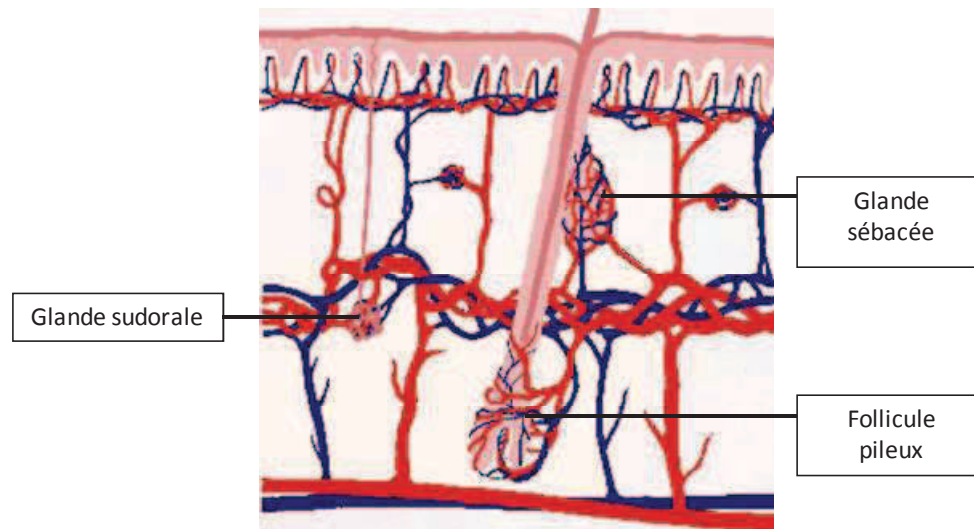


Figure 9 : Schéma du réseau artério-veineux de la peau. (d'après[1])

Innervation cutanée

La peau est innervée par deux types de fibres distinctes :

- Les fibres motrices appartiennent au système sympathique et innervent les muscles arrecteurs des poils, les cellules myoépithéliales, les glandes sébacées et les muscles entourant les artères dermo-épidermiques.
- Les fibres sensibles innervent l'hypoderme et se ramifient dans le derme pour aller innervier les follicules pileux. D'autres terminaisons rejoignent les mécanorécepteurs que sont les corpuscules de Meissner (qui assurent la perception tactile et sont situés dans la partie supérieure du derme) et les corpuscules de Pacini (qui assurent la perception de la pression et des vibrations et sont situés dans l'hypoderme et le derme profond). Il existe également des terminaisons libres dans l'épiderme, qui ne sont pas reliées à des mécanorécepteurs : elles sont à l'origine de la perception de la douleur et la chaleur (ou du froid).

1.3 Hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif lâche plus ou moins adipeux selon les régions de la peau et la nutrition de l'individu. Il n'est séparé du derme par aucune structure précise et repose sur les aponévroses musculaires.

Il est constitué de travées conjonctives fibreuses où passent vaisseaux et nerfs, et de globules graisseux faits d'adipocytes.

Il joue un rôle mécanique (amortissement des chocs) et constitue une réserve énergétique tout en contribuant à assurer une bonne thermorégulation de part ses propriétés isolantes.

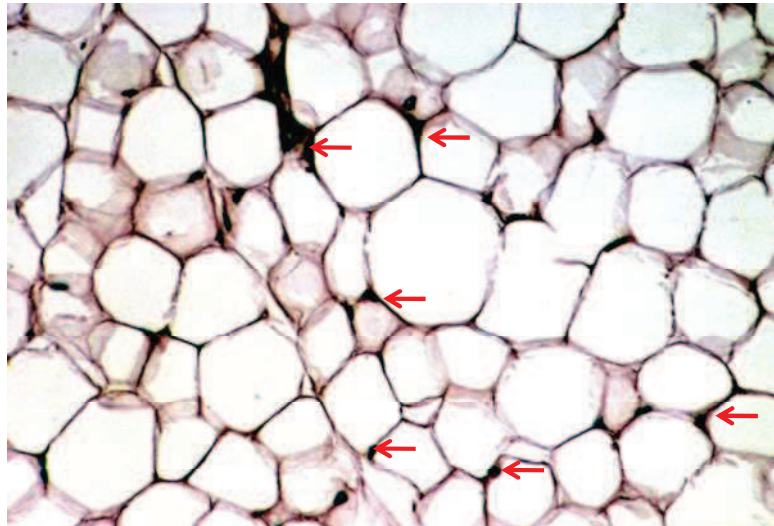


Figure 10 : coupe histologique montrant l'hypoderme (coloration HE). Les adipocytes apparaissent vides, en effet la cellule est occupée par une énorme goutte lipidique, qui lors de la déshydratation du tissu est extraite par les solvants utilisés. Les flèches indiquent les noyaux des adipocytes. (d'après [14])

2. Cicatrisation cutanée

Le processus de cicatrisation est un ensemble de phénomènes biologiques aboutissant à la reconstruction d'un tissu lésé. Le mécanisme de cicatrisation cutanée se déroule en plusieurs phases : une phase détersivo-inflammatoire, une phase proliférative au cours de laquelle se forme le tissu de granulation, et une phase de remodelage. Chaque étape est induite par la précédente et ne peut avoir lieu que si celle-ci est parfaitement achevée, ce qui souvent implique l'apoptose cellulaire. La compréhension du processus de cicatrisation est rendue complexe par le nombre des acteurs impliqués, qu'ils soient cellulaires, moléculaires ou macromoléculaires (cytokines, médiateurs inflammatoires, facteurs de croissance).

L'hémostase

Elle consiste en une vasoconstriction au niveau du site de la blessure afin de prévenir l'hémorragie, suivie du phénomène de coagulation. La coagulation provient de l'agrégation des plaquettes aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine. La présence de thrombine, de fibrine et la stimulation des plaquettes aboutit à la libération de cytokines et de nombreux facteurs de croissance : PDGF, EGF, TGF- α et β , IGF et FGF.

Les cellules endothéliales, activées par les plaquettes, expriment à leur surface des récepteurs provoquant l'arrivée sur le site traumatique, par diapédèse, des leucocytes circulants dans les vaisseaux voisins.

La phase détersivo-inflammatoire

L'apparition d'un grand nombre de médiateurs cellulaires sur le site de la blessure induisant par chimiotactisme l'activation des leucocytes annonce le début de la phase détersivo-inflammatoire, après environ 6 heures.

Les leucocytes sont principalement des polynucléaires neutrophiles chargés de prévenir l'infection en phagocytant les micro-organismes. Leur rôle détersif provient aussi de la production d'enzymes lytiques et de la libération d'oxyde nitrique NO. Les monocytes infiltrent la plaie à leur tour et sous l'influence du *Transforming Growth Factor* (TGF) deviennent des macrophages, type cellulaire prédominant entre le troisième et le cinquième jour. Les macrophages activés phagocytent les débris cellulaires et participent au débridement en sécrétant des protéases, élastases et collagénases. Ils libèrent ensuite une « deuxième vague » de cytokines (PDGF, VEGF, IL-1) qui va induire la migration cellulaire (cellules endothéliales et fibroblastes) : c'est le début de la phase proliférative. On notera que les lymphocytes jouent également un rôle important dans la prolifération des fibroblastes et qu'ils participent également à l'élimination des micro-organismes, de manière spécifique.

Phase proliférative : formation du tissu de granulation, épithélialisation

Le tissu de granulation est observé dès le quatrième jour. Il est constitué de fibroblastes abondants, d'un certain nombre de cellules inflammatoires et de nombreux capillaires sanguins conférant à ce tissu l'aspect granuleux qui lui donne son nom. On observe dans un premier temps une synthèse de collagène de type III et de fibronectine largement

supérieure à celle du collagène de type I, ainsi qu'une synthèse abondante d'acide hyaluronique. Cette composition particulière du tissu va favoriser la migration et la prolifération des myofibroblastes.

Les myofibroblastes

Sous l'action de cytokines et facteurs de croissance, les fibroblastes acquièrent une morphologie semblable à celle des cellules musculaires lisses : on parle alors de myofibroblastes. Ces cellules présentent en effet des faisceaux de filaments et expriment l'actine α -musculaire lisse, typique des cellules capables de se contracter comme les cellules musculaires lisses vasculaires par exemple. *Desmoulière et col* ont montré que lorsque le tissu de granulation évolue vers une cicatrice, les myofibroblastes exprimant l'actine α -musculaire lisse disparaissent par apoptose [15,16], mais ceux-ci subsistent dans le cas des cicatrices hypertrophiques, des chéloïdes et des fibroses [17].

Par ailleurs il a été observé que l'administration sous-cutanée de TGF- β 1 chez le rat conduit à la formation d'un tissu de granulation dans lequel les myofibroblastes exprimant l'actine α -musculaire lisse sont particulièrement abondants [18]. Ceci n'a pas été observé lors de l'administration d'autres cytokines et facteurs de croissances, comme par exemple PDGF et TNF α , malgré leur activité profibrotique.

Ces études témoignent de l'importance du rôle joué par les myofibroblastes et par les médiateurs induisant l'expression de l'actine α -musculaire lisse dans le bon déroulement des étapes de cicatrisation. Enfin l'apoptose cellulaire a une importance majeure lors des phases finales de la cicatrisation, dans la mesure où elle prévient la formation de cicatrices hypertrophiques.

Néoangiogénèse [19]

Lors de la phase inflammatoire, les cellules endothéliales et les péricytes migrent dans la matrice provisoire sous l'influence de médiateurs comme le VEGF, le FGF et l'EGF. Le processus de revascularisation débute en effet très tôt, dès l'agression tissulaire. Pour pouvoir migrer, les cellules endothéliales changent leur phénotype et projettent des pseudopodes à travers la membrane basale des vaisseaux, dégradée dans un premier temps par des collagénases.

Ré-épithélialisation

Immédiatement après l'apparition de la lésion, les kératinocytes des berges de la plaie migrent sur la matrice provisoire composée de fibrine et fibronectine en se détachant du tissu dermique et des kératinocytes voisins [20]. Lorsque la plaie est complètement recouverte de kératinocytes, la migration cesse et les kératinocytes retrouvent leur phénotype normal. Ils se raccrochent au tissu dermique et commencent à se différencier pour former l'épiderme. La différenciation aboutit à la production de cytokératines.

Remodelage

La cicatrice se forme dès lors que la réépithélialisation est complète, impliquant une diminution de la cellularité du tissu de granulation par apoptose [15]. Pendant la phase de remodelage, la synthèse des composants de la matrice extracellulaire est maintenue mais réduite et légèrement modifiée. Le collagène de type III est remplacé par du collagène de type I et des fibres d'élastine sont synthétisées. Par ailleurs le réseau artério-vasculaire se réorganise, et on observe l'apparition de fibres nerveuses et de structures sensibles. Les mélanocytes et les cellules de Langerhans apparaissent dans l'épiderme bien différencié, qui présente à nouveau une couche cornée normale. Le remodelage aboutit, après 12 à 18 mois, à la formation d'un tissu très proche du tissu natif d'un point de vue qualitatif, sans toutefois lui être superposable. On notera par exemple que la réapparition des annexes cutanées (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) n'est pas systématique.

2.5 Les facteurs défavorables à la cicatrisation

Bien que la plupart des plaies non étendues guérissent spontanément, il arrive que des complications induisent des retards de cicatrisation ou encore l'apparition d'une plaie chronique. Une plaie devient chronique lorsque la séquence normale des étapes de cicatrisation est perturbée.

Par exemple la production excessive d'exsudats peut conduire à la macération des tissus sains bordant la plaie et de ce fait empêcher la cicatrisation de la lésion [21]. Les exsudats produits par les plaies chroniques résultantes sont plus riches en protéinases [22], favorisant la destruction des tissus au détriment de la cicatrisation. La présence de corps étrangers

peut aussi causer une inflammation chronique retardant la cicatrisation et conduisant parfois à la formation de granulomes ou d'abcès.

Les bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyrogenes* peuvent empêcher le processus normal de cicatrisation de se mettre en place. La mauvaise prise en charge d'une plaie infectée peut conduire à une cellulite (inflammation cellulaire du tissu conjonctif sous-cutané), et dans les cas extrêmes à une bactériémie (présence des pathogènes dans le système sanguin) ou à une septicémie, pouvant toutes deux être fatales.

Il a été montré que la présence de *P.aeruginosa* et *S. aureus* réduit significativement la prise de greffe et que 94% des ulcères récidivants ou dont la cicatrisation est ralentie renferment *S. aureus* [23].

L'âge et le déséquilibre alimentaire réduisent aussi la capacité de l'organisme à combattre l'infection [24]. Les carences en protéines, vitamines (entre autres la vitamine C), et minéraux affectent la phase inflammatoire et la synthèse du collagène, augmentant la durée de cicatrisation [25-27]. Enfin des pathologies comme le diabète et l'anémie peuvent retarder la cicatrisation à cause des problèmes liés aux infections et par la perturbation de l'approvisionnement en oxygène, nutriments et cellules sanguines de la plaie [28].

Les traitements médicamenteux comme les stéroïdes suppriment les réponses inflammatoires de l'organisme et perturbent de ce fait la première étape de cicatrisation et peuvent aussi compromettre les réactions immunitaires nécessaires en cas de blessure. Il a ainsi été montré que chez le rat et l'homme les glucocorticoïdes perturbent la cicatrisation [29,30] et des études ont également été menées sur l'influence des glucocorticoïdes sur le facteur de croissance KGF (Keratinocyte Growth Factor). Ces travaux ont montré une inhibition de KGF *in vitro*, suggérant que les glucocorticoïdes peuvent avoir les mêmes effets *in vivo* durant la cicatrisation d'un tissu.

Dans le cas de brûlures thermiques, la cicatrisation est compliquée par la destruction des protéines, les thromboses capillaires et la nécrose tissulaire provoquées par la chaleur.

Les tissus brûlés ou nécrosés s'avèrent toxiques pour l'organisme et la cicatrisation d'une brûlure appelle à une stratégie thérapeutique particulière, elle sera décrite dans le chapitre suivant (« biomatériaux pour la cicatrisation des brûlures »).

3. Un modèle de choix pour l'étude de la cicatrisation cutanée : le porc

Un modèle animal est destiné à mimer un mécanisme humain précis [31,32] afin d'étudier et/ou déterminer la sécurité et l'efficacité de traitements médicaux [33].

Pour être pertinent et fiable, un modèle animal de cicatrisation cutanée se doit donc d'être sélectionné sur la base de similitudes démontrées entre les structures cutanées humaines et animales, et leurs mécanismes cicatriciels. Pour les mêmes raisons, les différences existant entre les deux systèmes doivent être bien connues afin d'identifier précisément les domaines d'utilisation du modèle, et leurs limites.

3.1 Similitudes structurales des tissus cutanés humains et porcins

La structure « normale » de la peau du porc, comme celle de toute espèce animale, est difficile à définir puisqu'elle varie selon la race, l'âge, l'environnement et la zone considérée. Toutefois on peut considérer que d'un point de vue structural, les peaux humaines et porcines peuvent être comparées.

- L'épiderme : d'une épaisseur semblable (30 à 200µm chez le porc [34-36] contre 50 à 200µm chez l'homme [37]), il est chez les deux espèces constitué de kératinocytes et de cellules dendritiques pigmentaires ou non. La présence de cellules de Langherans dans l'épiderme porcin a été mis en évidence par Vardaxis [34] qui a observé dans des cellules dendritiques la présence de granules de Birbeck, caractéristiques des cellules de Langherans.

Quelques différences peuvent toutefois être observées : l'épaisseur de la couche cornée est légèrement supérieure chez le porc, bien qu'elle soit toutefois également très épaisse chez l'homme au niveau des zones de frottements. D'autre part on notera que la migration d'un kératinocyte du stratum germinativum au stratum

corneum est estimée à 30 jours chez le porc, contre 26 à 28 jours chez l'homme [34,36]. Les mélanocytes, semblent être moins nombreux chez le porc [36,38].

- La jonction dermo-épidermique : on n'observe pas de différence structurale entre les deux espèces.
- Le derme : son épaisseur (1 à 2-2.5mm) est comparable. Le derme papillaire porcin est similaire au derme papillaire humain, à ceci près que les mastocytes porcins apparaissent enveloppés d'un matériel flocculeux dont le rôle est inconnu [39]. Le derme réticulaire est également similaire, bien que le contenu en fibre élastique du derme porcin soit plus faible que celui de l'homme. Il reste toutefois supérieur à celui d'autres espèces animales couramment utilisées en expérimentation animale [34,40].
- L'hypoderme : la structure est la même chez les deux espèces, mais on notera que cette couche est particulièrement épaisse chez le porc [34]. D'autre part, chez le porc comme chez l'homme, le muscle peaucier est quasi-absent alors que chez les rongeurs l'essentiel de la surface cutanée repose sur ce type de muscle.
- Le réseau artério-veineux : son organisation est la même, toutefois selon certains auteurs [34,36] les annexes épidermiques seraient moins vascularisées chez le porc que chez l'homme. On notera que la répartition des capillaires irrigant les papilles dermiques telle qu'on l'observe chez l'homme et le porc n'existe que chez ces deux espèces ainsi que chez la plupart des primates [39,40].
- Les annexes épidermiques : on retiendra que le porc est le seul mammifère de laboratoire dont la pilosité est naturellement réduite, tout comme celle de l'homme. Toutefois la distribution des follicules pileux est beaucoup moins variable que chez l'homme [34] et ainsi leur présence dans une plaie en est donc d'autant plus fréquente.

3.2 Similitudes des mécanismes cicatriciels humains et porcins

La cicatrisation des plaies cutanées humaines et porcines se déroulant selon la même cascade d'évènements vasculaires, cellulaires et moléculaires, la description de ces mêmes mécanismes chez le porc serait redondante.

Comme nous l'avons vu précédemment, la phase de contraction des berges de la plaie est générée par les myofibroblastes, il en est de même chez le porc. Toutefois il est

intéressant de noter que chez les autres espèces animales, notamment les rongeurs, la peau étant sous-tendue par un muscle peaucier, lors de la formation d'une plaie sectionnant ces mêmes muscles, on assiste à une contraction de leurs fibres. Ainsi ce phénomène tend à rapprocher les berges, et cette « contraction cutanée » jouent alors un rôle prépondérant dans la fermeture des plaies, phénomène non observable chez le porc et chez l'homme [33,41]. Pour cette raison et à cause de la densité de follicules pileux de la peau des rongeurs, ces derniers ne constituent pas le meilleur modèle pour la cicatrisation cutanée.

L'agneau a été choisi comme modèle au cours de certaines études [42,43], toutefois la production de laine et de lanoline (graisse de laine) par le mouton rend sa peau très différente de celle de l'homme et rend les applications topiques et le traitement des plaies difficile d'une manière générale.

Ainsi, comme l'ont établi Sullivan et coll. dans leur revue du sujet, le modèle porcin semble le plus adapté pour l'évaluation de soins thérapeutiques des plaies cutanées, les résultats obtenus étant plus proches de ceux obtenus au cours des études cliniques menées chez l'homme [33].

3.3 Cas de la modélisation d'une brûlure thermique chez le porc

La rétraction des tissus cicatriciels étant fréquente, il est primordial de prendre le phénomène en considération lors de la définition de l'espacement des brûlures expérimentales chez l'animal [44].

D'autre part, les brûlures profondes induisent une réaction inflammatoire et une douleur intenses, et la formation d'œdèmes ainsi que les pertes hydriques peuvent provoquer un choc hypovolémique, une anémie, une immunodépression et un hypermétabolisme conduisant à un état de dénutrition. Pour toutes ces raisons, il est essentiel de limiter chez l'animal le rapport surface totale des brûlures/surface cutanée totale, et de s'assurer qu'un suivi postopératoire particulièrement soigné sera mis en place, plus particulièrement en ce qui concerne l'analgésie.

Pour limiter les phénomènes de rétraction et la présence de tissus brûlés ou nécrosés toxiques pour l'organisme, une excision chirurgicale (parage) est couramment réalisée dans les premiers jours suivant la brûlure [44].

Les brûlures sont le plus souvent induites par l'intermédiaire de barres ou disques métalliques (laiton, aluminium, voire acier) chauffés à des températures variées [44-51]. Ils

sont alors mis en contact de la peau préalablement rasée, pour une durée généralement comprise entre 6 et 30 secondes. Singer [49] souligne le manque de standardisation des protocoles et leur manque de reproductibilité. Ses travaux ont permis de déterminer plus précisément les conditions expérimentales permettant d'obtenir des brûlures du second et du troisième degré [50,51]. Il décrit un modèle de plaie du second degré obtenu par l'application d'une barre d'aluminium chauffée à 80°C pendant 20 secondes et un modèle de plaie du troisième degré obtenu par l'application de cette même barre chauffée à 100°C pendant 30 secondes.

3.4 L'expérimentation vétérinaire chez le porc : questions pratiques

La qualité d'une étude de cicatrisation dépend comme nous l'avons évoqué précédemment de la validité du modèle animal choisi et du protocole chirurgical, mais également des conditions d'expérimentation. A ces conditions s'ajoutent les contraintes liées au respect de la réglementation et de l'éthique vétérinaire (directive 2010/63/UE et code rural).

Choix de la race

Les principales contraintes liées à l'utilisation du porc au cours d'une expérimentation animale sont sa taille et son poids, du fait des difficultés d'hébergement et de manipulation. C'est pourquoi aujourd'hui on utilise de plus en plus des porcs nains comme les miniporcs Sinclair (ou Hormel), Yacatan, Göttingen et Hanford, en particulier dans le cas d'études longues. On privilégiera toutefois l'utilisation de porcs charcutiers dans le cas d'études de courte durée, pour des raisons budgétaires.

Choix du sexe

Globalement le sexe de l'animal n'a pas d'influence sur l'évolution de la cicatrisation [41]. En revanche l'épaisseur de l'épiderme est plus importante chez le mâle, ce qui peut compliquer les observations dans le cas d'une expérimentation incluant des animaux de sexes différents.

Pour une étude de cicatrisation, il est préférable de choisir des femelles car les pansements entourant le corps de l'animal sont fréquemment souillés par l'urine chez le mâle, ce qui augmente les risques d'infection et de macération.

Age

Chez l'homme comme chez le porc, l'âge a une influence importante sur la structure du tissu cutané, et sur la vitesse du processus de cicatrisation (inversement proportionnelle à l'âge) [34,40]. Les animaux âgés seront également plus sensibles aux infections.

Il est donc essentiel que les animaux d'une même étude aient le même âge, et il est important de vérifier l'adéquation âge/poids afin d'éviter la surcharge graisseuse ou la malnutrition, préjudiciables à la cicatrisation.

L'animalerie

L'animalerie classique est beaucoup plus adaptée à l'étude de cicatrisation que la stabulation externe, du fait du risque de contamination des plaies.

Enfin pour limiter les risques de mutilation, l'hébergement des porcs doit être individuel.

Cette première partie nous amène à considérer la peau comme un organe complexe, constitué de l'assemblage de tissus différents (mais complémentaires) et riches en annexes essentielles à sa fonctionnalité : vaisseaux, cellules nerveuses, glandes etc...

Pour des raisons anatomiques et physiologiques, la peau de porc peut être considérée, d'après la littérature, comme un bon modèle pour l'étude de la peau humaine.

Nous avons mis en évidence la complexité des mécanismes de cicatrisation cutanée, dont chaque étape repose sur un équilibre biologique fragile. Cet équilibre peut être perturbé par de nombreux facteurs comme la production excessive d'exsudats, la présence de corps étranger, de bactéries, l'âge et les antécédents médicaux de l'individu, ainsi que la prise de certains médicaments comme les corticoïdes.

Le bon déroulement des étapes de cicatrisation est essentiel, dès les premières heures : en effet si la phase inflammatoire ne s'organise pas correctement, le tissu de granulation ne se développera pas et entraînera la chronicité de la lésion, et à l'inverse si la croissance de celui-ci devient anarchique, la cicatrice évoluera de manière hypertrophique.

La façon dont sera prise en charge une lésion va ainsi conditionner le bon déroulement des étapes de cicatrisation et donc la reconstruction d'un tissu de cutané de qualité. La prochaine partie de ce manuscrit est dédié aux principaux dispositifs médicaux et techniques chirurgicales développés au cours des dernières années pour le soin des brûlures.

2^{ème} partie : Biomatériaux pour la cicatrisation des brûlures

La brûlure conduit à une destruction partielle ou totale pouvant concerner la peau, les parties molles des tissus, ou même les os. Sa gravité dépend de sa localisation, de sa profondeur (le degré de brûlure), de l'étendue de la surface endommagée (en pourcentage de la surface totale) et de l'agent causal en question.

On notera que bien qu'il existe plusieurs autres types de brûlures (chimiques, électriques, par irradiations, par le froid...), nous ne nous intéresserons ici qu'aux brûlures thermiques et aux soins qui leur sont associés, bien que les dispositifs cicatrisants étudiés dans ce travail puissent être appliqués à divers types de brûlures et d'affections cutanées.

Nous ne ferons pas de distinction entre les patients atteints de brûlures d'origine civile ou militaire. En effet l'évaluation de la gravité d'une brûlure se fait selon les mêmes critères, et les blessés au combat sont évacués vers des unités de soins dispensant les mêmes traitements médicaux et chirurgicaux que dans le monde civil. Toutefois les brûlures occasionnées lors d'interventions militaires sont plus fréquemment associées à d'autres traumatismes, et souvent les blessés transitent par plusieurs centres de soins intermédiaires avant d'être finalement évacués vers des centres spécialisés, parfois éloignés de plusieurs milliers de kilomètres. Les délais de prise en charge médicale des brûlures tendent donc à être rallongés [52].

Plusieurs études cliniques comparatives ont été menées entre le devenir des patients civils d'une part et des patients brûlés durant les affrontements en Iraq et en Afghanistan d'autre part, tous traités dans le même centre de soins [53]. Il s'avère que le taux de mortalité est le même, en dépit de l'incidence plus importante de traumatismes associés et de brûlures du système respiratoire, en considérant des groupes de patients de même âge. Une autre étude portant sur les causes de décès survenus dans une unité de traitement des brûlés a montré que la première cause de décès était l'infection quelle que soit l'origine du blessé, toutefois les patients brûlés dans le cadre d'opérations militaires étaient plus sujets à développer des infections fatales ou des complications gastro-intestinales, tandis que les civils décédaient plus fréquemment des suites de complications cardiaques ou rénales [54].

1. La brûlure et son diagnostic

L'évaluation de la gravité d'une brûlure est primordiale car elle va conditionner la prise en charge du patient. Malgré les nombreuses avancées dans le domaine, il ne faut pas oublier que l'expérience de l'équipe médicale et l'évaluation que celle-ci va réaliser restent déterminantes. La gravité d'une brûlure est liée à sa profondeur, son étendue, au terrain et aux lésions associées, le cas échéant.

1.1 La profondeur de la brûlure

L'évaluation de la profondeur [55] repose sur la distinction entre, d'une part, les brûlures superficielles répondant à un traitement simple et, d'autre part, les brûlures profondes nécessitant une prise en charge spécifique. Il faut savoir que la qualité du résultat et le potentiel de cicatrisation dépendent de la rapidité de la mise en œuvre d'une stratégie thérapeutique adaptée, en terme d'antisepsie et de réanimation (si nécessaire) dans un premier temps, et de choix du dispositif curatif (type de pansements, biomatériaux, greffes...)

Brûlures superficielles

Premier degré

Il s'agit d'une atteinte superficielle de l'épiderme ayant l'aspect d'un érythème (coup de soleil) témoin de l'hypervascularisation du derme sous-jacent. La guérison se fait spontanément en quelques jours, sans séquelles, par desquamation accélérée.

Deuxième degré superficiel

Les couches profondes de l'épiderme sont atteintes et le derme n'est touché que dans sa partie la plus superficielle (écrêtement superficiel de la membrane basale). Cliniquement il s'agit d'une phlyctène douloureuse (ampoule, vésicule cutanée, élévation circonscrite de l'épiderme), en effet les terminaisons nerveuses et le derme sont intacts. La cicatrisation est obtenue en 10 jours environ, sans séquelles.

Brûlures profondes

Deuxième degré profond

La jonction dermo-épidermique est atteinte, ainsi que le derme réticulaire. Une cicatrisation est possible à partir des annexes épidermiques épargnées, mais va durer 6 à 8 semaines et donnera des cicatrices à tendance hypertrophiques. La lésion, rosée ou blanchâtre est caractérisée par une hypoesthésie (diminution de la sensibilité) plus ou moins franche.

Une hypoesthésie persistante ou s'aggravant dans les 48h est le signe d'une brûlure profonde devant être traitée comme une brûlure du 3^{ème} degré. Au contraire si l'hypoesthésie régresse, la brûlure guérira en général spontanément.

Troisième degré

L'épiderme et le derme sont détruits, le réseau vasculaire est coagulé. Le plus souvent les lésions sont blanchâtres mais localement l'aspect est variable et parfois atypique. A un stade avancé, la peau prend un aspect cartonné de couleur jaune, voire brunâtre, témoin de la mort tissulaire et de la dénaturation de la matrice extracellulaire. Au toucher l'anesthésie cutanée est totale. Il n'existe pas de cicatrisation spontanée, le recours à la chirurgie est indispensable ; en effet dans le cas contraire la nécrose des tissus va s'étendre.

Au-delà du derme, l'atteinte des tissus graisseux et musculaires constitue ce qu'on appelle la carbonisation.

1.2 La surface de la brûlure

L'étendue d'une surface brûlée doit être évaluée de façon très précise. On l'exprime généralement en pourcentage de la surface cutanée totale (SCT) en excluant les brûlures du premier degré. L'étendue de la brûlure est le plus souvent estimée à l'aide de la « règle des neuf de Wallace ». Pour les petites surfaces, on utilise la méthode de la paume de la main dans laquelle on considère que la surface de la paume de la main représente 1% de la SCT.

La gravité immédiate d'une brûlure est liée à ses répercussions métaboliques, en particulier concernant le risque de choc hypovolémique.

En effet la chaleur conduit à la coagulation des protéines immédiate dès l'application d'une température supérieure à 60°C, et il s'ensuit une déshydratation dermique

importante. Sous la zone brûlée les vaisseaux sont immédiatement victimes d'une perméabilité anormale aux protéines entraînant leur « fuite ». L'eau qui accompagne ces protéines va former un œdème très important aux dépens du volume sanguin circulant. Le choc hypovolémique résulte de cette diminution de la masse sanguine dont la conséquence principale est une baisse du retour veineux et du débit cardiaque.

Cette complication est susceptible de survenir dès 15% de surface corporelle brûlée profondément (10% chez le nourrisson, 5 à 10% chez le vieillard).

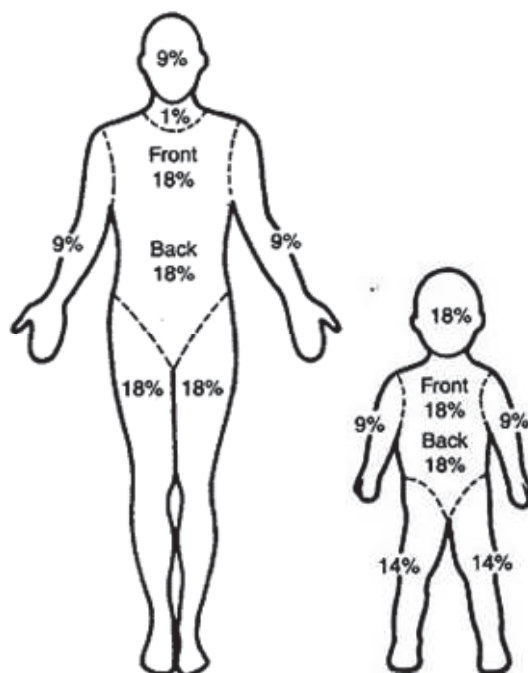


Figure 11 : Représentation du calcul de la surface cutanée selon la règle des neuf de Wallace (d'après [56])

1.3 Autres facteurs déterminant la gravité de la brûlure

L'âge

La mortalité du brûlé est significativement plus élevée avant 5 ans et après 65 ans. Certaines pathologies préexistantes aggravent le pronostic, en particulier chez le sujet âgé [57]. Chez les nourrissons et les jeunes enfants, la brûlure est grave dès l'atteinte de 10 % de la SCT atteints.

Localisation de la brûlure

Certaines localisations présentent des risques particuliers au niveau vital, fonctionnel ou infectieux :

- Les brûlures circulaires des membres et du cou

- Les brûlures de la face et des mains
- Les brûlures du périnée.

Enfin il est important de souligner l'importance des lésions associées à la brûlure, qu'il s'agissent d'une intoxication au monoxyde de carbone dans le cas d'un incendie domestique par exemple, de brûlures respiratoires pouvant constituer un facteur de gravité supplémentaire [58], de lésions traumatiques comme des fractures ou une compression musculaire prolongée [59,60], ou encore le « blast syndrom » qui caractérise l'ensemble des lésions consécutives à une explosion.

Chacune de ses lésions complique la prise en charge du patient, et réduit ses aptitudes à cicatriser dans les meilleures conditions.

Les pathologies associées

Le diabète est un facteur aggravant très sérieux de la brûlure. La gestion du diabète est souvent difficile chez le brûlé, mais néanmoins indispensable. En effet les infections sont plus fréquentes et un mauvais équilibre glycémique du diabète peut retarder la cicatrisation. Ce terrain est aussi favorable au développement des plaies cutanées chroniques, en particulier au niveau des pieds. En effet une glycémie élevée altère les vaisseaux sanguins, et dans certains cas les artères n'irriguent plus suffisamment les membres inférieurs. De ce fait les blessures mettent plus de temps à cicatriser et sont sujettes à l'infection. La blessure peut s'étendre et dans les cas les plus graves altérer définitivement une partie du pied.

Par ailleurs l'insuffisance cardiaque respiratoire ou rénale aggrave les problèmes immédiats liés au choc hypovolémique.

Enfin les patients souffrants d'immunodépression avant leur brûlure ont également un pronostic moins favorable, et doivent dans la mesure du possible être isolés dans un milieu stérile.

2. Soins des brûlures

Nous l'avons vu, l'évaluation de la brûlure est difficile, mais elle reste néanmoins déterminante pour la mise en place d'une stratégie adaptée, en particulier dans les cas les

plus graves. Dans cette partie nous étudierons les différentes stratégies thérapeutiques pouvant être mises en place selon les différents critères vus précédemment.

La première étape du traitement d'une brûlure est toujours la résection des tissus nécrosés (et des corps étrangers le cas échéant), on parle de débridement. C'est une étape importante car la présence de tissus nécrosés augmente le risque d'infection et de septicémie, et prolonge la phase inflammatoire. Le débridement d'une plaie peut-être réalisé par résection chirurgicale, hydrothérapie ou irrigation de la plaie, et par voie enzymatique faisant appel à des collagénases d'origine bactérienne, et des enzymes comme la streptokinase [61].

Thomas [62] a défini que l'objectif dans le choix d'un pansement était de garantir à la surface de la plaie un environnement dans lequel la cicatrisation pourraient être complète, rapide et se solderait par un aspect esthétique acceptable. Dans la plupart des cas, plusieurs types de pansements utilisés successivement sont nécessaires. Par exemple l'utilisation de compresses et de solution saline physiologique est nécessaire dans un premier temps pour absorber le sang et les exsudats. D'autres dispositifs peuvent aider à maintenir un environnement humide au cours des étapes suivantes de la cicatrisation, tandis que l'utilisation de pansements bioactifs, ou de biomatériaux peuvent jouer un rôle dans toutes les étapes de la régénération tissulaire.

2.1 Les greffes cutanées

Lorsque l'on s'intéresse au traitement des brûlures et aux différentes options thérapeutiques existantes, il apparaît incontournable de décrire les différentes techniques de greffes cutanées, puisque celles-ci constituent encore aujourd'hui la méthode de référence, particulièrement indiquée lorsque la perte tissulaire est importante du fait d'une brûlure profonde et étendue.

Toutefois Il est évident que plus la surface brûlée augmente, plus l'étendue des surfaces où il est possible de prélever de la peau diminue. Il a donc été nécessaire de trouver des techniques permettant de pallier ce déficit, comme l'allogreffe par exemple.

Les premières greffes cutanées ont été décrites par Jacques Reverdin, interne suisse des Hôpitaux de Paris, en 1869. Des greffes de peau totale ont été décrites à la même époque, en 1871 par Lawson à Londres, en 1872 par Ollier à Lyon, Wolff à Glasgow, et Krause à Altona en Allemagne [63].

Selon l'origine du greffon, on parlera d'autogreffe (lorsque le tissu est prélevé sur le patient lui-même), d'allogreffes (lorsque le greffon est prélevé sur un autre être humain), d'hétérogreffe ou xénogreffe (lorsque l'implant est d'origine animale).

Les autogreffes

Elles ne posent en principe pas problème immunologique, puisque le greffon est prélevé sur l'individu lui-même. On distingue plusieurs types d'autogreffes selon l'épaisseur du prélèvement.

Greffes de peau minces

Histologiquement, la peau est sectionnée au niveau des papilles dermiques. La tortuosité de la jonction dermo-épidermique implique que le prélèvement emporte une partie des cellules germinatives de l'épiderme permettant l'épidermisation du site receveur, tout en laissant en place des crêtes de la membrane basale permettant la cicatrisation du site donneur.

La durée de la cicatrisation de la zone donneuse et son risque d'hypertrophie cicatricielle sont d'autant plus grands que la greffe est épaisse. Les zones de prélèvement sont habituellement les membres (surtout cuisses et fesses), mais peuvent être aussi le thorax, l'abdomen, le dos et le cuir chevelu. Le prélèvement est fait avec un rasoir ou un dermatome.

Dans certains cas la greffe peut être expansée pour réaliser un filet, selon la technique décrite par Tanner et Vandeput [64,65]. La technique consiste à placer la greffe mince dans un « ampli-greffe » pour obtenir une résille, permettant de multiplier la surface couverte de 1.5 à 6 fois et de limiter l'étendue de la zone donneuse.

Les greffes de peau mince sont indiquées en cas de perte de substance étendue, les greffes expansées seront privilégiées en cas de déficit de zones donneuses, et pour couvrir des zones non fonctionnelles et non esthétiquement importantes.

Greffes semi-épaisses

L'épiderme et une partie du derme sont prélevés tout en laissant en place la partie profonde des annexes épidermiques (glandes sébacées et sudoripares, follicules pileux). Le prélèvement est réalisé de la même façon que dans le cas des greffes de peau minces, toutefois la cicatrisation de la zone donneuse sera plus lente, et laissera une cicatrice plus visible, souvent hypertrophique.

Les greffes de peau semi-épaisses sont indiquées pour des plaies en zone fonctionnelle ou esthétiquement importantes, au détriment de la zone donneuse.

Greffes de peau totale

Le tissu est prélevé jusqu'à l'hypoderme puis dégraissé. La cicatrisation spontanée du site donneur est impossible car la surface prélevée est souvent trop importante, elle devra être suturée. Les zones donneuses privilégiées du fait de la moindre exposition de la cicatrice et d'une certaine laxité cutanée sont par exemple la région rétro-auriculaire, les plis inguinaux, la région sus-claviculaire, le pli du coude... La surface des zones donneuses peut être augmentée par expansion durant les semaines précédant la greffe, à l'aide de ballonnets gonflables implantés en sous-cutanés.

Ces greffes sont utilisées lorsque la brûlure est située sur une zone fonctionnelle ou esthétiquement importante.

Les allogreffes

Les greffons sont prélevés sur des cadavres ou sur des sujets en coma dépassé puis conservés un mois à 4°C ou plusieurs mois dans l'azote liquide à -196°C. Ces greffes sont soumises à une législation très stricte relative à la transmission de certaines maladies infectieuses.

Les allogreffes font l'objet d'un rejet immunologique après 3 semaines. Toutefois l'emploi de cette technique permet chez le brûlé la couverture temporaire dans le cadre d'une stratégie thérapeutique :

- l'allogreffe des sites lésés permet d'attendre la cicatrisation de sites donneurs potentiels (légèrement brûlés ou déjà prélevés)
- dans le cas de la combinaison avec l'autogreffe, l'allogreffe permet la couverture immédiate de la lésion tandis que de petits greffons d'autogreffe (implantés

simultanément) vont croître et finalement se substituer à l'allogreffe. La méthode de Mowlen-Jackson consiste en la juxtaposition de bandes d'auto- et d'allogreffes, tandis que la technique d'Alexander consiste en une autogreffe très expansée recouverte d'un filet d'allogreffe beaucoup moins expansé.

- l'allogreffe est aussi utilisée pour la reconstruction *in vivo* de peau totale, selon la méthode de Cuono : après excision du tissu lésé, le site est recouvert d'allogreffe tandis que parallèlement sont mis en culture des kératinocytes. Lorsque la culture est prête, l'allo-épiderme (à fort pouvoir antigénique) est retiré tandis que le derme sous-jacent (à faible pouvoir antigénique), colonisé par les vaisseaux sanguins, est laissé en place et recouvert par la culture d'épiderme.

Hétérogreffes ou xéno greffes

Il s'agit de greffon d'origine animale. Actuellement on utilise la peau de porc conservée ou lyophilisée. La xéno greffe doit être considérée comme un "pansement d'origine biologique", présentant l'avantage d'une disponibilité permanente.

Le développement des techniques de greffe cutanée a constitué une véritable révolution qui a bouleversé la prise en charge du brûlé grave.

Le chirurgien a été confronté à un nouveau défi : comment remplacer la peau détruite quand la quasi-totalité du revêtement cutané a disparu ?

La raréfaction des sites donneurs de greffes dermo-épidermiques autologues doit alors être compensée par des procédés substitutifs. Il est important de noter que même si l'expansion en filet des greffons peut permettre de recouvrir une surface plus importante, les cicatrices des sites donneurs sont parfois très étendues, plus étendues encore que les lésions initiales, et le brûlé reste marqué à vie. Bien que l'allogreffe puisse plus ou moins répondre au problème, le résultat n'est pas toujours satisfaisant.

Enfin faire appel à la technique des greffes cutanées implique une chirurgie lourde, des délais de soins importants, pour un résultat qui n'est pas toujours à la hauteur des espérances du patient et des équipes médicales.

La recherche et le développement de nouveaux produits de remplacement de la peau sont en plein essor, aussi bien pour la synthèse de substituts cutanés artificiels que pour la culture *ex vivo* des éléments cellulaires de la peau.

2.2 Pansements et biomatériaux

Un long chemin a été parcouru depuis l'application rudimentaire sur les plaies de plantes, de graisses animales et de miel jusqu'à la mise au point de biomatériaux cellularisés complexes biomimétiques (scaffolds). On notera que certaines herbes médicinales traditionnelles toujours utilisées en Afrique montrent des propriétés antibactériennes [66-68].

C'est d'abord la découverte de l'asepsie et de l'importance de l'hygiène au XIX siècle qui a conduit à de grandes avancées dans la conception de dispositifs cicatrisants, à l'image de Pasteur [69] qui a attiré l'attention sur les germes propagés par l'eau et les dispositifs/instruments utilisés.

Classification des dispositifs

Les pansements sont classés en catégories « primaire », « secondaire » et « island dressing » [70] : le pansement « primaire » est en contact direct avec la plaie, et recouvert d'un pansement « secondaire ». Le terme « island dressing » désigne les pansements possédant en leur centre une couche absorbante entourée d'une couche adhésive.

Ils sont également classés selon le type de matériaux utilisés (cellulose, alginate, collagène...), la forme physique du pansement (pommade, film, mousse, gel...) et leur fonction (débridement, occlusion, absorbance, adhésion) [71].

Certains dispositifs, en maintenant un environnement humide, permettent un débridement autolytique, c'est-à-dire le débridement naturel de la plaie par élimination physiologique spontanée des tissus nécrotiques. C'est le cas de la plupart des pansements « semi-occlusifs », terme qui désigne les dispositifs imperméables à l'eau et aux bactéries, mais perméables à l'oxygène et à la vapeur d'eau. D'autres au contraire laissent traverser les exsudats qui sont ensuite absorbés par le pansement secondaire.

Enfin certains pansements sont choisis pour leur capacité à absorber les exsudats, ou encore leur caractère adhésif qui facilite la mise en place. On prendra soin toutefois de différencier l'adhésion et l'adhérence : on privilégiera en effet les pansements non-adhérents à la plaie qui préservent les tissus néoformés et minimisent la douleur lors du changement.

De nombreuses études et revues se sont intéressées aux différents dispositifs existants et aux différentes façons de les « classer » [62,72,73]. Ces classifications ont toutefois leurs limites : certains dispositifs répondent en effet à plusieurs critères [70].

D'une manière générale, on peut dire que le dispositif idéal serait un pansement qui maintienne un climat humide propice à la cicatrisation de la plaie, tout en étant indolore, absorbant, adhésif pour tenir et maintenir l'humidité de la plaie, un pansement qui soit facile à enlever (ou que l'on enlève pas), hypoallergénique, économique, qui garantisse les échanges gazeux (O_2 - CO_2). Il ne devrait pas absorber les exsudats trop rapidement au risque de conduire à l'assèchement de la plaie et à la formation d'une croûte trop précoces, mais suffisamment rapidement pour ne pas que les exsudats s'accumulent sous le pansement. Ces nombreux critères rendent la conception d'un pansement complexe.

Dans la suite de ce chapitre, on distinguera les pansements « traditionnels » des dispositifs de dernière génération, ces derniers seront décrits selon leur composition et leur forme physique.

Les soins traditionnels

Bien qu'ils soient moins largement utilisés pour le soin des brûlures aujourd'hui, ils gardent un intérêt dans certains cas cliniques (brûlures superficielles), ou en utilisation conjointe avec les dispositifs plus complexes et plus récents. On entendra par soins traditionnels l'ensemble des pansements « secs » et des formulations topiques, qu'elles soient liquides ou semi-solides.

Les formulations topiques

Il peut s'agir de solutions, de suspensions, d'émulsions, de pommades ou de crèmes.

Il est possible d'utiliser par exemple une solution saline physiologique pour nettoyer la plaie et retirer les tissus morts ou bien pour irriguer une plaie sèche et ainsi faciliter et rendre moins douloureux le changement d'un pansement [74-76]. Des solutions comme la povidone-iodine sont également utilisées durant l'étape de débridement pour retirer les tissus nécrosés et éviter la macération tout en jouant le rôle d'agent antimicrobien [77].

Les agents topiques sous forme liquide ont toutefois un temps de contact avec la plaie et donc une activité limitée dans la durée, en particulier en cas de suppuration.

C'est parce qu'elles restent plus longtemps au contact de la plaie que les crèmes sont souvent préférées (ex: crèmes contenant du sulfadiazine d'argent ou les pommades contenant du nitrate d'argent). Toutefois dans le cas des plaies très exsudatives, ces topiques ont tendance à perdre rapidement leurs propriétés rhéologiques (chute de la viscosité).

Les pansements traditionnels

Il s'agit de pansements « secs » qui ne contribuent pas à maintenir la plaie dans un environnement hydraté : coton hydrophile, bandes synthétiques ou naturelles, compresses.

Les compresses sont faites de coton tissé ou non tissé, de polyester ou de la combinaison de ces deux matériaux. L'historique et les problèmes associés à leur utilisation ont été revus par Jones *et al* [78]. L'utilisation de compresses imprégnées pour les plaies chirurgicales est largement remise en questions face aux nouvelles générations de dispositifs aujourd'hui sur le marché [79]. Le principal inconvénient des pansements réalisés avec des compresses, en dépit de leur faible coût [80], est qu'ils doivent être changés très fréquemment pour éviter la macération et préserver les tissus en cours de régénération. D'autre part même si les compresses peuvent prévenir une contamination bactérienne lorsqu'elles sont sèches, lorsqu'elles sont imprégnées d'exsudats, elles n'assurent plus leur rôle de barrière.

Enfin les compresses ont tendance à adhérer à la plaie et leur remplacement s'avère quelquefois douloureux pour le patient, et endommage le tissu fraîchement reconstruit [81] ce qui pourrait compromettre le processus de cicatrisation. Les compresses assurent une faible occlusion et favorisent le dessèchement du lit de la plaie, dans une moindre mesure dans le cas des compresses imprégnées de paraffine ou vaseline (ex : Tulle Gras). Il a été suggéré de réserver l'utilisation des pansements traditionnels en tant que pansement secondaire pour absorber les exsudats et protéger le pansement primaire au contact de la plaie [72].

Dans le cas des brûlures et des plaies chroniques, ces dispositifs ont été largement remplacés par des dispositifs de nouvelle génération, plus complexes, permettant de s'affranchir des problèmes rencontrés avec les agents topiques qui ne restent pas

suffisamment longtemps au contact de la peau, et des problèmes de déshydratation rencontrés avec les compresses et autres pansements traditionnels.

Nouvelle génération de pansements

Leur caractéristique essentielle est de maintenir une certaine hydratation de la plaie et de favoriser la cicatrisation. Ces dispositifs sont généralement classés selon leur composition ou leur forme physique qui peut être gel, film, mousse...

- Les hydrocolloïdes

Les pansements hydrocolloïdes sont aujourd'hui largement utilisés. Leurs propriétés, mode d'action et leur indication ont été l'objet de plusieurs revues dans la littérature [76,81]. Le terme « hydrocolloïde » désigne des dispositifs obtenus à partir de solutions colloïdales (d'agents gélifiants) associées avec d'autres matériaux de type élastomères ou adhésifs. Les agents gélifiants couramment utilisés sont la gélatine, la pectine, et la carboxyméthylcellulose (CMC). Comme exemples de pansements hydrocolloïdes couramment utilisés, on peut citer Granuflex™, DuoDerm™ et Aquacel™ (ConvaTec), Comfeel™ (Coloplast), Tegaserb™ (3M SANTE), et Algoplaque™ (URGO).

Ils se présentent sous la forme de films ou feuilles, ou en association avec d'autres matériaux comme les alginates. Le principal intérêt des pansements hydrocolloïdes est qu'ils adhèrent aussi bien sur les sites humides que secs, contrairement aux autres dispositifs. Dans leur état initial, les hydrocolloïdes sont imperméables à l'eau, mais après avoir absorbé les exsudats, un changement de la structure physique a lieu, aboutissant à la formation d'un gel couvrant la plaie. Ils deviennent ainsi progressivement perméables à l'air et à l'eau [82]. Hoekstra *et al* [83] ont montré l'intérêt d'un pansement hydrocolloïde par rapport à un pansement traditionnel pour la cicatrisation de plaies chez le rat, en particulier lors de la phase inflammatoire initiale.

Pour les raisons de perméabilité évoquées précédemment, les pansements hydrocolloïdes sont très souvent couverts d'une couche occlusive pour prévenir les échanges de vapeur d'eau entre la plaie et le milieu extérieur. En générale si les exsudats ne sont pas trop importants, ce type de pansement peut être changé une fois par semaine. Ce type de pansement très occlusif ne devra pas être utilisé en cas de plaies infectées, car il

favorise la colonisation bactérienne en maintenant un environnement humide et l'accumulation des exsudats.

Toutefois des études microscopiques ont montré l'intérêt de certains hydrocolloïdes à base de CMC dans la lutte contre les bactéries, par rapport à des pansements alginates [84].

Dans cette étude, il a été montré que le gel produit par les hydrocolloïdes contenant de la CMC était capable d'encapsuler une large quantité de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* contrairement aux gels d'alginate pour lesquels le phénomène était significativement moins important[84]. Nemeth *et al* [85] ont reporté qu'en comparaison avec un pansement non adhérent classique, les patients ayant été soignés avec des hydrocolloïdes ont ressenti une douleur moindre et donc consommé moins d'analgésiques, tout en appréciant le confort de pouvoir se laver sans risquer d'endommager le pansement.

- Les alginates

Les alginates sont des polysaccharides à structure bloc constitués d'unités mannuroniques et guluroniques. Les pansements d'alginate sont produits à partir d'alginates de sodium ou de calcium, et sont commercialisés principalement sous forme de lyophilisats (éponges poreuses).

Les alginates sont utilisés pour la conception de pansements pour leur capacité à former des 'gels' (ou solutions visqueuses) au contact des exsudats. La gélification des alginates au contact de la plaie limite les sécrétions et la contamination bactérienne[86]. Le gel ou la solution visqueuse formé en contact avec la plaie absorbe les exsudats sans adhérer à la plaie, ce qui favorise la détersion.

Les alginates riches en acide mannuronique (par exemple Sorbsan™, Maersk) forment des gels mous, flexibles, tandis que les alginates riches en acide guluronique (par exemple Kaltostat™, ConvaTec) forment des gels plus rigides lorsqu'ils se gorgent d'exsudats.

Le film de gel formé à l'interface pansement/plaie permet de maintenir la plaie dans un environnement humide optimal pour la cicatrisation.

Les propriétés gélifiantes des alginates sont attribuées à la présence de l'ion calcium qui permet la formation de complexes Ca^{++} /Acide guluronique qui conduisent à un réseau se dégradant lentement en contact avec la plaie (en particulier par échange des ions calcium et sodium). Cette capacité à former un réseau tridimensionnel fait des alginates un matériau apprécié pour l'ingénierie tissulaire dans le cadre de la conception de « scaffolds » [87,88].

Une étude comparative a montré que les gels d'alginate restaient en contact avec la plaie plus longtemps que les gels formés par les hydrocolloïdes [89].

Le rôle joué par les alginate de calcium au cours de la cicatrisation a été étudié par Schmidt et col. [90]. Cette étude menée chez la souris suggère que les alginate de calcium pourraient favoriser la stimulation de fibroblastes. Grâce à une étude menée in vitro, Doyle et col.[91] ont précisé que la prolifération des fibroblastes augmentait mais pas leur motilité. Thomas et col.[92] ont établi que les alginate pouvaient activer les macrophages humains et contribuer à la libération de TNF α (Tumor Necrosis Factor- α) qui initie les phénomènes inflammatoires constituant la première étape de cicatrisation. Les ions calcium présents dans les pansements alginate jouent également un rôle physiologique lorsqu'ils sont relargués dans la plaie, entre autre durant la phase d'hémostase[93,94].

Les pansements alginate présentent un grand intérêt pour le soin des plaies moyennement à fortement exsudatives. Leur retrait ou changement n'est pas douloureux et préserve le tissu de granulation fraîchement formé. Il s'agit d'un matériau biodégradable, dont les propriétés d'adhérence et d'absorbance sont variables et donc modulables, selon la structure des alginate utilisés [95].

Les limites de ces dispositifs concernent les plaies sèches, et celles recouvertes d'une couche dure de tissus nécrosés, puisque les alginate ont besoin d'un environnement humide pour gélifier et devenir efficaces.

- Les pansements hydrogels

Il s'agit de matériaux hydrophiles insolubles, les dispositifs sur le marché sont constitués de polymères synthétiques comme les polyméthacrylates et la polyvinylpyrrolidone. Certains pansements sont faits à partir d'associations hydrogels/alginate (Nu-gel™, Johnson & Johnson Purilon™ et Coloplast™, par exemple).

Les hydrogels peuvent se présenter sous la forme de gel amorphe ou de feuilles et films solides. Pour préparer ces feuilles et films, les composants polymères sont réticulés de manière à emprisonner des molécules d'eau.

Lay-Flurrie [96] a répertorié et analysé les résultats de plusieurs études concernant l'efficacité de ces dispositifs et le type de plaies auxquelles ils se destinent.

Lorsqu'ils sont appliqués sous la forme non réticulée, les gels nécessitent généralement d'être recouverts d'un pansement secondaire et remplacés fréquemment. Les films eux ne nécessitent pas l'emploi d'un pansement secondaire : ce sont des films polymères semi-

perméables, avec ou sans bords adhésifs, dont la structure contrôle le passage de la vapeur d'eau.

Les hydrogels contiennent de 70 à 90% d'eau et ne peuvent par conséquent pas absorber une quantité importante d'exsudats. Ils sont donc principalement indiqués pour le soin des plaies peu ou modérément suintantes, l'accumulation des exsudats pouvant conduire à la macération des tissus et à la prolifération bactérienne. Une autre limite de ces dispositifs est leur fragilité : ils ont en général de faibles propriétés mécaniques et sont de ce fait assez difficile à manipuler par le personnel soignant.

Les hydrogels présentent néanmoins la plupart des caractéristiques du dispositif idéal pour la cicatrisation : ils conviennent à la fois à des plaies profondes, sèches, et nécrotiques, du fait de leur capacité à réhydrater les tissus morts et ils facilitent ainsi le débridement autolytique. Les hydrogels sont perméables, ils permettent les échanges gazeux et de vapeur d'eau, d'autre part ils limitent la réponse inflammatoire.

Leur non-adhérence, et la sensation de fraîcheur à la surface de la plaie contribue à réduire la douleur du patient, comme l'a reporté Moody [97].

Enfin les hydrogels laissent peu de résidus dans la plaie au moment de leur retrait ce qui améliore la réépithélialisation des plaies [98]. Morgan considère que les hydrogels sont adaptés à toutes les étapes de la cicatrisation, avec pour seule limite les plaies infectées ou très exsudatives.

- Films polymères adhésifs

Les premiers films polymères adhésifs étaient constitués de dérivés du nylon associés à du polyéthylène qui les rendait occlusifs. Ces dispositifs aux propriétés absorbantes très limitées favorisent l'accumulation d'exsudats et donc la macération et la prolifération bactérienne [98]. Ils nécessitent d'être souvent remplacés et les plaies irriguées à l'aide d'une solution saline, il s'agit donc de dispositifs peu adaptés pour la cicatrisation des plaies.

Les nouvelles générations de films polymères adhésifs sont constituées de polyuréthanes plus poreux et plus perméables à la vapeur d'eau et aux gaz, tout en restant imperméables aux liquides, et aux exsudats [99]. Ces films sont transparents, et très déformables en restant élastiques : ils s'adaptent facilement à la géométrie de la plaie et résistent bien aux mouvements. Leur principale limite est leur faible épaisseur : ils ne sont pas adaptés à des plaies profondes, présentant une cavité importante.

Il existe un grand nombre de films adhésifs polyuréthanes sur le marché (Opsite™, Smith and Nephew ; Bioocclusive™, Johnson & Johnson ; Tegaderm™, 3M Santé, etc...) qui se différencient les uns des autres par leur perméabilité, leur adhésivité et leur élasticité [100].

- Pansements biologiques

Ils désignent des biomatériaux jouant un rôle dans le procédé de cicatrisation, on les qualifie de « bioactifs ». Les pansements bioactifs incluent aussi les produits dérivés de l'ingénierie tissulaire, qu'ils proviennent de sources naturelles ou artificielles [101].

Ces dispositifs combinent généralement des polymères comme le collagène [102], l'acide hyaluronique [103], le chitosane [104-108], les alginates et l'élastine.

Les biomatériaux présentent l'avantage d'être biodégradables, de présenter une bonne biocompatibilité et une très faible toxicité. Dans certains cas, on leur associe des agents antibactériens, ou encore des facteurs de croissance.

Le collagène est un constituant naturel du tissu conjonctif et une protéine structurale majeure. Ses propriétés physiques, chimiques, biologiques et immunologiques ont été largement décrites dans la littérature [102,109]. Le collagène est utilisé sous forme de lyophilisats capables d'absorber les exsudats, les débris cellulaires et les cellules inflammatoires ayant phagocyté des bactéries [110]. Ces matrices peuvent également contenir différents principes actifs et servir ainsi de réservoir à relargage contrôlé, pour différentes classes d'antibiotiques par exemple [111].

L'acide hyaluronique quant à lui est un glycosaminoglycane, constituant de la matrice extracellulaire, aux propriétés physico-chimiques et biologiques particulièrement intéressantes. Il est naturellement biocompatible, biodégradable et non immunogène [112]. L'acide hyaluronique est également utilisé sous forme d'hydrogels réticulés pour le relargage contrôlé [113]. L'acide hyaluronique est décrit comme un matériau de choix pour la cicatrisation des plaies aiguës [114].

Enfin le chitosane est connu pour accélérer la formation du tissu de granulation au cours de la phase proliférative [115], et les pansements à base de chitosane sont réputés plus efficaces que les soins traditionnels d'une part et les hydrogels synthétiques d'autres part [116]. Les propriétés biologiques du chitosane et son intérêt pour la cicatrisation seront décrits dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

- Substituts cutanés

Les dispositifs décrits précédemment ne sont malheureusement pas suffisants lorsqu'il y a une perte de tissu importante dans le cas des brûlures profondes et/ou étendues.

Nous l'avons vu, la première étape des soins d'une brûlure est la résection du tissu brûlé, puisque la présence de celui-ci entretient une réaction inflammatoire amplifiée, éventuellement dangereuse pour la survie du patient. Quand la brûlure atteint plus de 40% de la surface totale du corps, la greffe de peau ne peut être complète et immédiate, et il n'est pas concevable de laisser exposées les plaies de résection qui évolueraient vers la surinfection : la couverture s'impose. Outre l'allogreffe qui joue le rôle d'une couverture temporaire dans l'attente de greffe, le thérapeute dispose aujourd'hui d'autres options pour le recouvrement des plaies.

Les progrès réalisés dans le design des biomatériaux d'une part, et dans le domaine de la culture cellulaire d'autre part, ont conduit au développement d'une nouvelle génération de substituts dermiques [117,118]. Ces dispositifs sont des « scaffolds » acellulaires ou au contraire contenant des cellules de peau ; ils comblent la perte cutanée et sont colonisés par le tissu en reconstruction. Dans la littérature, ils sont décrits comme des systèmes capables d'imiter les réponses physiologiques normales ayant lieu au cours de la cicatrisation [119,120].

Les dispositifs acellulaires sont produits à partir de collagène synthétique combinés à des constituants de la matrice extracellulaire comme l'acide hyaluronique (ex Integra™) ou à partir de derme dont on a retiré les composants cellulaires, tout en préservant l'architecture du tissu (ex Alloderm™).

Les substituts cutanés contenant des cellules sont composés d'une matrice polymère biodégradable de collagène et de glycosaminoglycanes par exemple (Apligraf™) dans laquelle sontensemencées des cellules de peau.

Quelques uns des substituts cutanés disponibles sur le marché sont présentés dans le tableau 1.

Ces « scaffolds » ont des propriétés mécaniques et anatomiques très proches du tissu qu'ils remplacent [121]. Après leur implantation, la matrice se dégrade progressivement pour laisser place à une matrice de tissu conjonctif.

Ces dispositifs sont adaptés au relargage contrôlé de molécules bioactives comme les facteurs de croissance par exemple [119]. En effet, des pores se forment dans la matrice lorsque celle-ci se dégrade, et permettent la libération de principes actifs, tandis que dans

ces mêmes pores des cellules vivantes peuvent pénétrer et proliférer pour remplacer petit à petit le tissu perdu ou endommagé.

Les effets du collagène sur la reconstruction du derme ont été étudiés par Ruszczak *et al* [122]. Il a été établi que la combinaison de collagène avec des cellules dermiques du patient, des facteurs de croissance, des cytokines et des agents antibiotiques peut accélérer la formation du tissu de granulation et également l'étape de réépithélialisation.

Malgré leur potentiel pour le soin des plaies chroniques et des brûlures graves, ces dispositifs sont encore assez peu utilisés du fait de leur coût, du risque d'infection, des problèmes d'immunogénicité et de la nécessité de prélever des cellules et donc de générer une nouvelle plaie chez le patient.

Dispositif	Fabricant	Type	Composants principaux
Integra™	Integra LifeScience	Peau artificielle	Matrice collagène/chondroïtine sulfate couverte d'un film silicone
Biobrane™	Dow Hickham/Bertek Pharmaceuticals	Substitut cutané biosynthétique	Silicone, tulle de nylon, collagène
Alloderm™	Lifecell Corporation	Substitut dermique acellulaire	Derme humain privé de ses composants cellulaires
Dermagraft™	Advanced Tissue Sciences	Substitut dermique	Culture de fibroblastes humains sur un tulle de polyglactine biodégradable
Epicel™	Genzyme Biosurgery	Substitut épidermique	Culture de kératinocytes humains autologues
Myskin™	Celltran Limited	Substitut épidermique	Culture de kératinocytes humains autologues sur un substrat silicone
TranCyte™	Advanced Tissue Sciences	Epiderme synthétique	Acide polyglycolique/ acide polylactique, protéines de la MEC provenant de fibroblastes humains allogéniques, collagène
Apligraf™	Organogenesis	Substitut dermo-épidermique	Collagène bovin de type I dans une suspension de fibroblastes
Hyalograft 3-D™	Fidia Advanced Biopolymers	Substitut épidermique	Fibroblastes humains sur une membrane micro-perforée de benzyl hualuronate
Laserskin™	Fidia Advanced Biopolymers	Substitut épidermique	Fibroblastes humains sur une membrane micro-perforée de benzyl hualuronate
Bioseed™	BioTissue Technologies	Substitut épidermique	Fibrine et culture de kératinocytes humains autologues

Tableau 1 : exemples de substituts cutanés disponibles sur le marché en 2010.

Comme nous l'avons mis en évidence dans les deux premières parties, la peau est un organe complexe et sa cicatrisation devient parfois un véritable challenge pour les équipes médicales, tant au niveau de la gestion de la douleur chez le patient, que dans le choix de la stratégie curative.

Dès lors il devient essentiel lors du développement d'un nouveau dispositif cicatrisant de bien choisir les matériaux, et d'adapter leur mise en œuvre aux exigences physiologiques.

Pour limiter les problèmes de biocompatibilité, nous avons choisi d'utiliser un polymère naturel, mieux toléré par l'organisme vivant que les polymères synthétiques. Parmi les polymères naturels, notre choix s'est orienté vers le chitosane qui présente des propriétés bioactives aujourd'hui largement reconnues par la communauté scientifique.

La partie suivante est consacrée aux principales caractéristiques physico-chimiques et biologiques du chitosane, caractéristiques qui sont à l'origine d'un certain nombre d'interactions favorables avec les milieux vivants. Nous argumenterons en faveur de sa mise en œuvre sous forme d'hydrogels en vue de son utilisation en ingénierie tissulaire en tant que dispositif destiné à la cicatrisation cutanée.

3^{ème} partie : le chitosane, un polymère de choix pour la cicatrisation cutanée

1. Le chitosane : définition et structure

C'est en 1811 que la chitine est isolée pour la première fois par le professeur Henri Braconnot, directeur du jardin botanique de Nancy.

Mais c'est un peu plus tard que débute l'histoire du chitosane, lorsqu'en 1859 C. Rouget traite la chitine avec de la potasse et examine les différentes formes désacétylées obtenues. Le nom de chitosane sera proposé par Hoppe-Seyler en 1894. Il est peu présent dans la biomasse, on le retrouve à l'état naturel dans la paroi cellulaire de certains champignons, de bactéries, levures et algues [123]. Le chitosane est principalement obtenu par modification chimique de la chitine, le polymère naturel le plus abondant dans la biomasse après la cellulose, en termes de production annuelle par biosynthèse [124]. La chitine est un constituant essentiel de l'exosquelette des crustacés, des insectes et de l'endosquelette des céphalopodes, comme la sèche et le calmar. On la retrouve également dans la paroi cellulaire de certains champignons.

Le chitosane est un polysaccharide linéaire constitué d'unités D-glucosamine et N-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques $\beta(1\rightarrow4)$ (figure 12). La différence entre le chitosane et la chitine réside dans la proportion d'unités acétylées, qu'on appelle DA (degré d'acétylation).

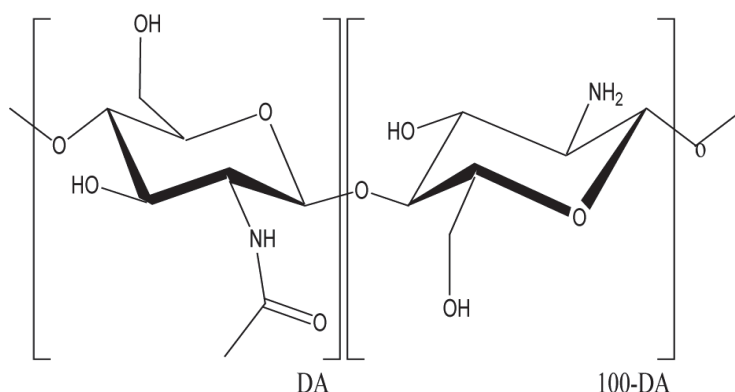


Figure 12 : Structure chimique du chitosane

Etant donné qu'il n'existe pas de nomenclature officielle pour distinguer le chitosane de la chitine, on fait appel à la solubilité des polymères pour les différencier [125] :

- la chitine est insoluble en milieux aqueux et dans des solvants organiques courants, mais se solubilise dans le diméthylacétamide (DMAc) en présence de chlorure de lithium.
- le chitosane est soluble dans les solutions aqueuses d'acides dilués (acétique, chlorhydrique par exemple).

Lorsque le chitosane est obtenu par réacétylation d'un chitosane de bas degré d'acétylation (en solution), il s'agit d'un chitosane parfaitement statistique, et il reste soluble en milieu acide dilué jusqu'à un degré d'acétylation (DA) proche de 65-70%. Lorsque le chitosane est obtenu par désacétylation (à l'état solide) de la chitine, il s'agit d'un polymère dont la distribution des unités acétylées et nonacétylées est plus hétérogène, et il reste soluble pour un $DA < 40\%$. Le chitosane ne se définit donc pas uniquement par son DA.

Selon son origine et les procédés d'obtention mis en œuvre, la masse molaire moyenne en masse du chitosane de bas DA peut atteindre jusqu'à $600\,000\text{ g.mol}^{-1}$. De telles masses sont intéressantes pour la réalisation d'hydrogels. On obtient ce type de polymère de haute qualité à partir d'endosquelettes puisqu'ils ne sont pas associés à de la phase minérale. Il n'y a alors pas de traitement acide susceptible d'induire une hydrolyse du polymère et une dégradation.

Dans la perspective d'une application en ingénierie tissulaire, nous allons nous intéresser principalement aux propriétés biologiques du chitosane et à sa très large utilisation dans le domaine médical.

2. Propriétés biologiques du chitosane

Biocompatibilité

La non toxicité du chitosane a été démontrée chez le rat et la souris pour une utilisation en tant qu'additif alimentaire et dans la formulation cosmétiques.

La dose létale LD_{50} est estimée à 1.5g.kg^{-1} par voie orale chez le rat, à 10g.kg^{-1} en sous-cutané chez la souris, à 5.2g.kg^{-1} en injection intra-péritonéale chez la souris et 3g.kg^{-1} chez le rat.

Une seule étude menée chez le chien rapporte toutefois des cas d'anorexie et de pneumonie fatale, pour une administration sous-cutanée de chitosane de l'ordre de 50mg.kg⁻¹ et 150mg.kg⁻¹ respectivement [126].

Globalement, et pour des doses administrées raisonnables, la non-toxicité du chitosane est admise [127].

Chatelet *et al* [128] ont étudié *in vitro* la cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes et de kératinocytes. Il a été établi qu'un chitosane de faible DA favorise la prolifération des kératinocytes

Biodégradabilité

La biodégradabilité d'un biomatériau joue un rôle important dans les performances à long terme du dispositif, car elle affecte la prolifération cellulaire et la réponse de l'hôte.

Le chitosane est dégradé par le milieu vivant, principalement par des phénomènes d'hydrolyses enzymatiques et non enzymatiques, entre autre par le monoxyde d'azote (NO) qui joue un rôle pivot dans l'immunodépression consécutive aux brûlures graves [129,130].

Les lysozymes sont les principaux responsables de la dégradation enzymatique du chitosane, en agissant sur les portions plus acétylés [131]. Les produits de dégradations obtenus sont des oligomères de chitosane, dont la distribution de taille est large et dont les propriétés biologiques sont encore mal connues en fonction de la structure moléculaire.

La vitesse de dégradation du chitosane est fonction du DA qui joue également sur la cristallinité des formes physiques solides et hydrogels. Ainsi le chitosane de faible DA connaît une vitesse de dégradation la plus lente *in vivo* (pouvant atteindre plusieurs mois) tandis que le chitosane de DA élevé est dégradé rapidement [132-134].

Propriétés bactériologiques et fongostatiques

L'une des propriétés conférant au chitosane un grand intérêt pour les applications médicales et agro-alimentaires est son activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis d'un large spectre de bactéries et champignons. Par exemple Aimin et coll. [135] ont montré que

le chitosane peut réduire la vitesse de développement de l'infection dans le cas d'une ostéomyélite induite expérimentalement chez des lapins par *Staphylococcus aureus*.

Le caractère bactériostatique du chitosane a été mis en évidence vis-à-vis de nombreuses autres souches: *Escherichia*, *Pseudomonas*, et de champignons : *Candida*, *Fusarium*, *Saccharomyces*, etc. [136,137].

Concernant le mécanisme d'action du chitosane, une hypothèse est que la nature cationique du chitosane interagit avec les résidus chargés négativement qui sont présents à la surface de la membrane externe des bactéries [138] ; ceci conduit à une perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne [139] et donc à une fuite des composants intracellulaires.

Le chitosane posséderait également la faculté de se lier spécifiquement avec certaines macromolécules et formerait des liaisons avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme : il perturberait alors l'action de certaines enzymes et inhiberait la synthèse d'ARNm en se liant à l'ADN bactérien, après pénétration dans le noyau du microorganisme [140]. Cette hypothèse est toutefois plus controversée que celle basée sur l'interaction avec la membrane externe.

Plusieurs auteurs rapportent que l'activité antibactérienne du chitosane est plus importante vis-à-vis des bactéries gram-positives que vis-à-vis des gram-négatives [136,137,141,142]. No et col. ont montré que les propriétés antibactériennes des oligomères sont plus limitées [137]. En ce qui concerne l'influence du degré d'acétylation, Jung et col. ont observé que le chitosane de bas DA présente une activité bactériostatique supérieure [136].

Le chitosane est décrit dans la littérature comme un flocculant, capable d'agglutiner les cellules microbiennes. Strand *et al* [143] ont montré que dans le cas d'*Escherichia coli*, plus le DA est élevé, plus le pouvoir flocculant est grand.

Propriétés bioactives

Dans le cadre de la cicatrisation des plaies, une question importante est à la réponse du tissu hôte lors de l'implantation de divers dispositifs à base de chitosane. En général ces dispositifs ont été à l'origine de réactions semblables à celles observées en présence de corps étrangers minimes, avec peu ou pas d'encapsulation fibreuse.

Les étapes de cicatrisation s'enchainent normalement, il se forme un tissu de granulation normal, et souvent on observe une angiogénèse accélérée. Il a été décrit que le chitosane et ses oligomères stimulent la prolifération locale de cellules immunitaires et finalement contribuent à l'intégration du tissu implanté dans le tissu hôte [144].

Okamoto et coll. [107] ont montré à la suite d'expérimentations menées chez le chien, que le chitosane agit sur toutes les étapes de la cicatrisation. Le premier rôle joué par le chitosane est de favoriser l'hémostase. Les pansements hémostatiques à base de chitosane sont d'ailleurs largement utilisés, le plus célèbre étant sans doute celui proposé par le laboratoire Hemcon : un composé d'un acétate de chitosane lyophilisé. Le chitosane stimule ensuite la prolifération des fibroblastes et influe le comportement migratoire des neutrophiles et des macrophages, ce qui a pour conséquence de modifier les processus de reconstruction que sont la fibroplasie et la réépithélialisation [107,145].

Ueno et coll. [108] ont étudié l'influence de non-tissés de chitosane sur la cicatrisation de plaies chirurgicales chez des chiens. Là encore, il a été mis en évidence que le chitosane favorise, dès le troisième jour, l'infiltration des macrophages et des cellules inflammatoires, et plus particulièrement des polymorphonucléaires. Ces cellules vont produire un large répertoire de substances pro-inflammatoires et de facteurs de croissance.

Cette étude a également montré que le chitosane favorise l'étape de granulation (entre le 9^{ème} et le 15^{ème} jour) : en outre la quantité de collagène III dans les tissus reformés est significativement plus importante pour les plaies soignées avec du chitosane.

Effet du chitosane sur les macrophages

Comme nous l'avons vu (*figure 12*), le chitosane est composé d'unités glucosamine (GlcN) et N-acétyl-glucosamine (GlcNAc), or les macrophages expriment des récepteurs pour le mannose et la GlcNAc. La fixation de la GlcNAc sur les récepteurs spécifiques est décrite comme une condition préalable indispensable à l'activation des macrophages [146-149]. Les macrophages jouent un rôle important dans le procédé de cicatrisation, leur activation conduit à la libération d'un grand nombre de médiateurs biologiques (tels que des facteurs de croissance) ainsi qu'à la phagocytose des corps étrangers [150].

Nishimura et coll [151] décrivent une stimulation de la production d'interleukine IL-1 par les macrophages en présence de chitosane. La prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène sont affectés par IL-1, IL-6 et TNF- α [150].

Par ailleurs Ueno et coll [152] ont observé que la production *in vitro* de TGF- β 1 et PDGF par des macrophages dérivés de monocytes humains est plus importante en présence de chitosane. Ces résultats indiquent que, du fait de la production de ces facteurs de croissance, le chitosane favorise la production de matrice extracellulaire.

Effet du chitosane sur les fibroblastes

La reconstruction du tissu conjonctif fait suite à la prolifération des fibroblastes et à la synthèse de matrice extracellulaire. Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'application de chitosane favorise le développement du tissu de granulation, et la synthèse d'une matrice extracellulaire riche en collagène. Ceci sous-entend que le chitosane participe à la production de la matrice extracellulaire et à la prolifération des fibroblastes, de manière directe ou indirecte.

Mori et coll [153] d'une part et Ueno et coll [152] d'autre part ont montré respectivement que lors de cultures *in vitro* de fibroblastes L929, la présence de chitosane ne favorise ni la prolifération cellulaire, ni la production de matrice extracellulaire. Ceci implique que, *in vivo*, la prolifération des fibroblastes, ainsi que la production de matrice extracellulaire sont favorisées de manière indirecte, par l'intermédiaire de médiateurs biologiques tels que les facteurs de croissance, comme nous l'avons évoqué précédemment, et non de manière directe.

Effet du chitosane sur les kératinocytes

Chatelet *et al* [128] ont étudié l'influence du degré d'acétylation sur les propriétés biologiques de films de chitosane. Au cours de cette étude il a été établi que quel que soit le degré d'acétylation du chitosane utilisé, tous les films étaient cytocompatibles vis-à-vis des fibroblastes et des kératinocytes. Il a également été observé que plus le degré d'acétylation est bas, plus l'adhésion cellulaire sur les films est importante. Le faible DA semble également favoriser davantage la prolifération des kératinocytes.

Toutefois, et de manière un peu contradictoire, Denuzière et coll. [154] ont observé que dans le cas de l'utilisation de chitosane de plus faible degré de polymérisation (DP=60), la prolifération des kératinocytes en culture sur des films était inhibée pour des DA de 11% et 2.5%.

3. L'utilisation du chitosane sous forme d'hydrogel

3.1 Définition d'un hydrogel

On peut définir un gel comme « un réseau constitué de chaînes polymères interconnectées et gonflées par un solvant dont la concentration est supérieure à 90% » [155].

Un gel ne doit pas se dissoudre dans son solvant, et ne doit pas fluer sous son propre poids, même après plusieurs heures. On qualifie d'« hydrogels » les gels dont le réseau polymère est gonflé par l'eau. Il faut toutefois différencier les gels hydrogels de type chimique des hydrogels physiques.

L'hydrogel chimique se caractérise par la nature covalente des liaisons constituant le réseau tridimensionnel. Du fait de la présence de ces liaisons covalentes, les hydrogels chimiques ne sont ni thermoréversibles (retour à l'état liquide par chauffage impossible), ni solvoréversibles (dissolution dans le solvant initial impossible). Les hydrogels chimiques sont obtenus grâce à l'utilisation d'agents réticulant comme le glutaraldéhyde, le glyoxal, le diéthyl squarate et l'acide oxalique par exemple [156].

L'hydrogel physique quant à lui présente un réseau polymère dont les nœuds de réticulation sont uniquement de nature physique, comme des liaisons hydrogènes, des interactions de Van der Waals (liaisons hydrophobes), des interactions ioniques ou encore la formation de zones cristallines. Ce type de liaison étant de plus faible énergie que les liaisons covalentes, les hydrogels physiques sont souvent réversibles, selon les conditions de température et de pH.

3.2 Cas des hydrogels physiques de chitosane

Nous nous intéresserons ici uniquement à la description des hydrogels physiques de chitosane obtenus sans agents réticulants, puisque l'utilisation d'agents réticulants (souvent toxiques) peut porter préjudice à la biocompatibilité finale du dispositif médical. De plus l'élaboration d'hydrogels par la voie chimique ne permet pas de conserver la structure physique du chitosane et donc ses propriétés biologiques.

Comme nous l'avons déjà évoqué, les hydrogels physiques résultent d'interactions ioniques ou d'interactions plus faibles comme les liaisons hydrogènes ou encore des interactions hydrophobes.

Ainsi il est possible d'obtenir des hydrogels de chitosane par réticulation ionique (complexation) ou formation de complexes polyélectrolytes (figure 13). La réticulation ionique du chitosane implique l'interaction des groupes NH_3^+ avec des anions ou des molécules anioniques, par exemple les ions cobalt, sulfate [157,158], citrate [158], les anions métalliques Mo(VI) [159,160] ou Pt(II) [161] ou les molécules anioniques contenant des groupes phosphates (beta-glycerophosphate [162], tripolyphosphate (TPP) [163-166] et polyphosphate [163]). Cette technique de réticulation est principalement utilisée pour la formation de nanoparticules destinées à la vectorisation et au relargage de principes actifs [157,158,163,165,167]. La principale difficulté rencontrée est le suivi et donc le contrôle de la réaction de réticulation, ce qui conduit à des propriétés structurales difficiles à maîtriser. Dans le cadre de la réticulation du chitosane par formation de complexes polyélectrolytes, la nature des interactions est la même, mais la réaction a alors lieu entre deux polymères chargés et dont les charges sont opposées. La formation du complexe est due au gain entropique lié à la libération des contre-ions initialement associés à chacun des polyélectrolytes. Les polyanions les plus utilisés pour la complexation du chitosane sont les polysaccharides qui présentent un groupe carboxylique COO^- (alginates [168], pectine [169], xanthane, acide hyaluronique [170]) et tous les polysaccharides possédant un groupe sulfate [171,172]. Le chitosane peut également former des complexes avec des protéines (le collagène [173-175], l'ADN [176]), l'acide polylactique (PLA) ou encore certains polymères synthétiques. Cette technique permet dans la plupart des cas de préserver la biocompatibilité et la bioactivité du système puisqu'elle ne fait pas appel à des catalyseurs ou initiateurs pouvant être toxiques.

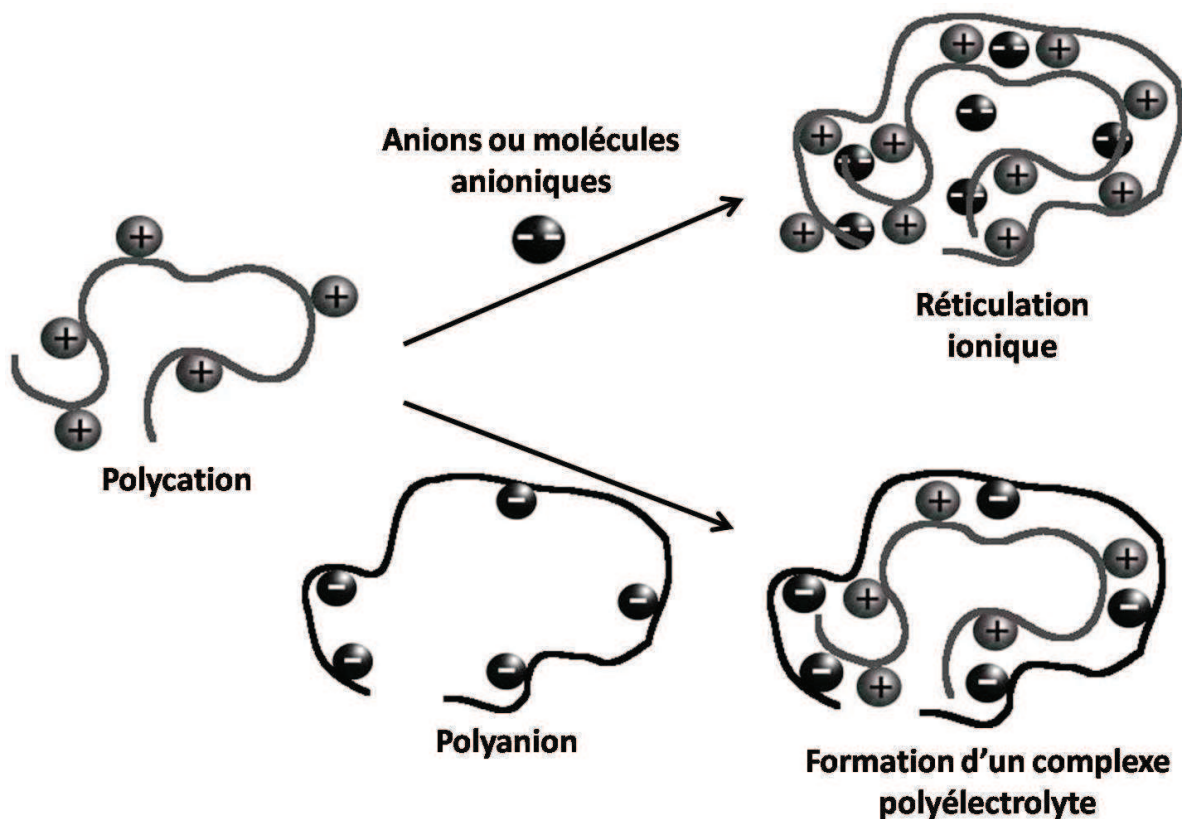


Figure 13 : obtention d'hydrogels par réticulation ionique (complexation à l'aide d'anions ou molécules anioniques) ou formation de complexes polyélectrolytes entre polycations et polyanions.

D'autre part il est possible d'obtenir des hydrogels physiques de chitosane en modifiant la balance des interactions hydrophiles/hydrophobes, grâce à la modification de certains paramètres physico-chimiques, notamment le potentiel électrostatique du polymère [177]. Des hydrogels physiques de chitosane ont été ainsi obtenus sans agent réticulant par Chaussard *et al* [178] en 2002. Plus récemment ce procédé de gélification a été optimisé par Montembault et coll. [177] puis par Boucard et coll. [179]. La biocompatibilité et surtout la bioactivité de ces systèmes ont été largement étudiées et démontrées [180-182].

Le procédé d'obtention des hydrogels physiques de chitosane par cette voie sera décrit plus en détails dans la partie « protocoles expérimentaux ».

3.3 Origine de l'activité biologique des hydrogels : concept de leurre des milieux biologiques

L'intérêt des hydrogels chimiques ou physiques est largement étudié dans la littérature, en particulier pour les applications biomédicales et pharmaceutiques [183-186]. Les

hydrogels sont des réseaux tridimensionnels hydrophiles capables d'absorber de grandes quantités d'eau ou de fluides biologiques et qui ainsi ressemblent beaucoup au tissu vivant.

Les hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire doivent répondre à un certain nombre de critères pour promouvoir la formation d'un nouveau tissu. Ces critères incluent d'une part des paramètres classiques d'ordre physique, tels que des propriétés mécaniques et un mode de biodégradation adaptés ; et des caractéristiques d'ordre biologique d'autre part, en particulier une bonne biocompatibilité. La biocompatibilité fait référence à la capacité d'un matériau à ne pas causer de dommages aux cellules adjacentes et à ne pas induire de réponse défavorable. Ce type de réponse peut-être par exemple une réponse inflammatoire qui sera jugée défavorable si elle affecte la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules de l'hôte et des cellules transplantées (dans le cas de matériaux cellularisés). Pour cette raison seront généralement préférés les polymères naturels qui se caractérisent par une biocompatibilité adaptée, tandis que les polymères synthétiques sont plus fréquemment à l'origine de réponses biologiques défavorables.

Les hydrogels peuvent être préparés de manière à répondre à différents stimuli biologiques, comme le pH, la force ionique ou la température. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les hydrogels utilisés sont souvent des « scaffolds » dont la porosité est de grande importance. En effet la taille moyenne des pores, leur distribution de taille, et leurs interconnexions sont des facteurs déterminants pour la diffusion des fluides, du matériel cellulaire, voire d'éventuels principes actifs au travers du gel dans le cas de systèmes à relargage contrôlé.

Les hydrogels sont parfois difficiles à manipuler, ils peuvent être fragiles du fait de propriétés mécaniques faibles. Les propriétés mécaniques d'un hydrogel dépendent à la fois de la rigidité initiale des chaînes de polymère, du type et de la densité de réticulation ainsi que de ses propriétés de gonflements. D'autre part, dans le cas des systèmes « scaffold », il est parfois difficile de procéder à la gélification après l'ajout de cellules ou de principes actifs dans le milieu. Enfin un challenge reste sans doute l'étape de stérilisation, car ces dispositifs sont souvent très sensibles à un traitement stérilisant et deviennent encore plus fragiles, et sont parfois complètement dégradés.

Toutefois la forme hydrogel présente de nombreux avantages dans le domaine de l'ingénierie tissulaire :

- L'environnement aqueux protège les cellules et les principes actifs les plus fragiles (peptides, protéines, etc.).

- La diffusion des éléments nutritifs et des différents métabolites est facilitée, ainsi que les échanges d'une manière générale.

- Dans certains cas le gel peut être injecté sous forme liquide et il gélifie ensuite à la température corporelle.

- Les hydrogels montrent généralement une bonne biocompatibilité.

Les hydrogels physiques de chitosane présentent les qualités précitées et sont de ce fait utilisés en ingénierie tissulaire. Différentes études ont conduit à considérer ces matériaux comme des « leurres des milieux biologiques » [181], concept résumant très bien l'intérêt de l'utilisation d'hydrogels dans le cadre des applications médicales, et dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en général.

Un matériau leurre des milieux biologiques doit répondre à deux critères : être un leurre de part sa structure chimique, et être un leurre physique de part son organisation structurale.

Leurre chimique

Une molécule leurre des milieux biologiques, devra tout d'abord être une molécule biocompatible absente dans l'organisme des mammifères. Toutefois elle devra être constituée (au moins partiellement) d'unités structurales présentes dans la matrice extracellulaire des tissus vivants.

Le chitosane répond à ce premier critère puisque c'est une molécule qui n'est présente dans la matrice extracellulaire d'aucun mammifère, mais dont la structure chimique se constitue en partie d'éléments composants de la matrice extracellulaire (MEC) : les résidus N-acétyl-D-Glucosamine ainsi que la liaison glycosidique de type $\beta(1\rightarrow4)$; tandis que le fragment D-glucosamine est lui totalement absent de la MEC des mammifères.

Leurre physique

Les tissus vivants sont constitués de polymères naturels (polysaccharides entre autres) dont les chaînes sont organisées en réseaux tridimensionnels fortement hydratés : ce sont des hydrogels physiques. Ainsi il existe une similitude entre les tissus vivants et les hydrogels de chitosane, du fait de leur organisation structurale et de leur forte teneur en eau.

Nous l'avons vu, le chitosane est un polymère de choix pour les applications médicales, du fait de sa structure chimique et des propriétés biologiques qui en résultent. Toutefois ces mêmes réponses biologiques sont tributaires d'un certain nombre de paramètres, comme la masse molaire, le degré d'acétylation, etc...

Mais la façon dont est mis en œuvre le chitosane ainsi que la forme physique sous laquelle il est présenté au milieu vivant ont également leur importance. L'utilisation d'hydrogels est préconisée par différents auteurs pour l'ingénierie tissulaire pour leur bonne biocompatibilité et leur structure tridimensionnelle fortement hydratée leur conférant un caractère partiellement biomimétique. D'autre part les propriétés de tels matériaux sont assez modulables et peuvent être adaptées aux besoins thérapeutiques.

Cette partie bibliographique a montré la complexité de la structure cutanée et des mécanismes de cicatrisation. Une prise en charge adaptée est primordiale pour la survie du patient dans un premier temps, et pour s'assurer d'une reconstruction tissulaire fonctionnelle et esthétique par la suite. L'étude de la bibliographie a notamment montré que les brûlures sont particulièrement exposées aux risques d'infections, et que celles-ci peuvent avoir des conséquences graves sur la qualité du tissu reconstruit, voire sur le pronostic vital du patient dans les cas les plus graves. Il y a donc un intérêt à développer un dispositif médical capable de limiter les infections et favoriser les différents aspects de la cicatrisation.

Dans le cadre de brûlures étendues, les greffes de peau sont plus difficiles à mettre en œuvre du fait du faible nombre de sites donneurs. On doit alors faire appels à des substituts, temporaires ou définitifs, dans l'attente de la cicatrisation des sites de prélèvements ou dans l'attente des cultures cellulaires *in vitro*. Ces cultures cellulaires, qui n'ont pas été décrites dans ce manuscrit, font appel à des techniques complexes très coûteuses et nécessitent la disponibilité d'un grand nombre de personnels qualifiés. Ainsi l'intérêt présenté par les substituts cutanés artificiels, cellularisés ou non, est de plus en plus reconnu.

Ces substituts font très souvent appel aux biopolymères en raison de leur bonne biocompatibilité et de leur caractère plus ou moins biomimétique. Le chitosane est de ce fait un bon choix dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, entre autre pour sa capacité à agir vis-à-vis de l'organisme comme un « leurre des milieux biologiques ».

Le dispositif que nous allons décrire dans ce travail de thèse est un hydrogel physique bicouche de chitosane, qui répond à plusieurs des critères énoncés précédemment puisqu'il s'agit d'un pansement fortement hydraté permettant le maintien d'un milieu humide, facile à manipuler et capable d'absorber les exsudats. Ces pansements sont destinés à la cicatrisation de brûlures et plaies profondes ainsi qu'à la cicatrisation des plaies secondaires liées au prélèvement de greffons. Leur utilisation en tant que matériau de recouvrement provisoire dans l'attente de greffe semble également envisageable.

La suite de ce manuscrit concerne la technique de gélification utilisée ainsi que les différentes expérimentations mises en œuvre pour caractériser l'intérêt biologique des hydrogels physiques de chitosane pour la cicatrisation cutanée après brûlures profondes.

Références bibliographiques

(chapitre 1)

- [1] www.histo-moleculaire.com, website, (2010).
- [2] C. Prost-Squarcioni, [Current findings on skin melanocytes and melanogenesis in human beings], *Morphologie*, 85 (2001).
- [3] D. Schmitt, C. Dezutterdambuyant, M. J. Staquet, and J. Thivolet, The Langerhans Cell - the Dendritic Cell of Skin and Mucosa, *M S-Medecine Sciences*, 5 (1989) 103-111.
- [4] J. Valladeau and S. Saeland, La Langerine et les granules de Birbeck des cellules de Langerhans, *M S-Medecine Sciences*, 16 (2000) 979-980.
- [5] J. Valladeau, Les cellules de Langherans, *M S-Medecine Sciences*, 22 (2006) 144-148.
- [6] J. Banchereau and R. M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature*, 392 (1998) 245-252.
- [7] R. M. Steinman, The Dendritic Cell System and Its Role in Immunogenicity, *Annual Review of Immunology*, 9 (1991) 271-296.
- [8] R. Moll, I. Moll, and W. W. Franke, Identification of Merkel Cells in Human-Skin by Specific Cytokeratin Antibodies - Changes of Cell-Density and Distribution in Fetal and Adult Plantar Epidermis, *Differentiation*, 28 (1984) 136-154.
- [9] L. Borradori and A. Sonnenberg, Structures and function of hemidesmosomes: More than simple adhesion complexes, *Journal of Investigative Dermatology*, 112 (1999) 411-418.
- [10] A. Stevens and J. Lowe, *Histologie humaine*, 2006.
- [11] C. Piérard-Franchimont and G.-E. Piérard, Physiologie de la sécrétion sudorale, *Dermatologie*, 98-025-A-10 (2007).
- [12] B. Macé, *Histologie, bases fondamentales*, 2008.
- [13] E. Hoyo, J. Kanitakis, and D. Schmitt, The Dermal Dendrocyte, *Pathologie Biologie*, 41 (1993) 613-618.
- [14] CHU Pitié Salpêtrière, www.chups.jussieu.fr, website, (2010).
- [15] A. Desmouliere, M. Redard, I. Darby, and G. Gabbiani, Apoptosis Mediates the Decrease in Cellularity During the Transition Between Granulation-Tissue and Scar, *American Journal of Pathology*, 146 (1995) 56-66.
- [16] A. Desmouliere, C. Badid, M. L. BochatonPiallat, and G. Gabbiani, Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29 (1997) 19-30.
- [17] A. Desmouliere, Factors Influencing Myofibroblast Differentiation During Wound-Healing and Fibrosis, *Cell Biology International*, 19 (1995) 471-476.
- [18] A. Desmouliere, A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani, Transforming Growth-Factor-Beta-1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation-Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts, *Journal of Cell Biology*, 122 (1993) 103-111.

- [19] N. Ilan, S. Mahooti, and J. A. Madri, Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis, *Journal of Cell Science*, 111 (1998) 3621-3631.
- [20] R. A. F. Clark, J. M. Lanigan, P. Dellapelle, E. Manseau, H. F. Dvorak, and R. B. Colvin, Fibronectin and Fibrin Provide A Provisional Matrix for Epidermal-Cell Migration During Wound Reepithelialization, *Journal of Investigative Dermatology*, 79 (1982) 264-269.
- [21] K. F. Cutting and R. J. White, Maceration of the skin and wound bed. 1: Its nature and causes, *J Wound Care*, 11 (2002) 275-278.
- [22] W. Y. Chen, A. A. Rogers, and M. J. Lydon, Characterization of biologic properties of wound fluid collected during early stages of wound healing, *Journal of Investigative Dermatology*, 99 (1992) 559-564.
- [23] E. L. Gilliland, N. Nathwani, C. J. Dore, and J. D. Lewis, Bacterial colonisation of leg ulcers and its effect on the success rate of skin grafting, *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 70 (1988) 105-108.
- [24] J. Lee, R. Singletary, K. Schmader, D. J. Anderson, M. Bolognesi, and K. S. Kaye, Surgical site infection in the elderly following orthopaedic surgery. Risk factors and outcomes, *J Bone Joint Surg. Am.*, 88 (2006) 1705-1712.
- [25] H. Hemila and R. M. Douglas, Vitamin C and acute respiratory infections, *Int. J Tuberc. Lung Dis.*, 3 (1999) 756-761.
- [26] A. I. Rojas and T. J. Phillips, Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes, and zinc, *Dermatologic Surgery*, 25 (1999) 601-604.
- [27] G. K. Patel, The role of nutrition in the management of lower extremity wounds, *Int J Low Extrem Wounds*, 4 (2005) 12-22.
- [28] V. Falanga, Wound healing and its impairment in the diabetic foot, *Lancet*, 366 (2005) 1736-1743.
- [29] G. F. Pierce, T. A. Mustoe, J. Lingelbach, V. R. Masakowski, P. Gramates, and T. F. Deuel, Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S A*, 86 (1989) 2229-2233.
- [30] L. S. Beck, L. Deguzman, W. P. Lee, Y. Xu, M. W. Siegel, and E. P. Amento, One Systemic Administration of Transforming Growth-Factor-Beta-1 Reverses Age-Impaired Or Glucocorticoid-Impaired Wound-Healing, *Journal of Clinical Investigation*, 92 (1993) 2841-2849.
- [31] J. M. Davidson, Animal models for wound repair, *Archives of Dermatological Research*, 290 (1998) S1-S11.
- [32] R. W. Phillips and M. E. Tumbleson, Models, In : *Swine in biomedical research* (Tumbleson ed.) Plenum Press, London and New York, (1986) 437-440.
- [33] T. P. Sullivan, W. H. Eaglstein, S. C. Davis, and P. Mertz, The pig as a model for human wound healing, *Wound Repair and Regeneration*, 9 (2001) 66-76.

- [34] N. J. Vardaxis, T. A. Brans, M. E. Boon, R. W. Kreis, and L. M. Marres, Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: Implications for human wound healing studies, *Journal of Anatomy*, 190 (1997) 601-611.
- [35] A. Besnard, La peau du porc : particularités et cicatrisation par seconde intention (dynamique cellulaire précoce), Thèse de doctorat vétérinaire, Rennes, (1985).
- [36] J. Guichaoua, La peau du porc : histologie, histochimie, ultrastructure - comparaison avec l'homme, Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, (1977).
- [37] C. Ohannessian, La cicatrisation chez le brûlé, Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, (1987).
- [38] J. Poirier, Histologie de la peau et de ses annexes, In : histologie humaine, Maloine., (1979) 6-25.
- [39] R. M. Lavker, G. Dong, P. S. Zheng, and G. F. Murphy, Hairless Micropig Skin - A Novel Model for Studies of Cutaneous Biology, *American Journal of Pathology*, 138 (1991) 687-697.
- [40] G. Aubin, A. Fourtanier, and A. Hunt, Le porc, modèle animal en dermocosmétologie, Compte-rendu du congrès organisé par les Laboratoires de Recherche de l'Oréal, (1986).
- [41] P. G. Hayward and M. C. Robson, Animal-Models of Wound Contraction, *Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair*, 365 (1991) 301-312.
- [42] L. Cuttle, M. Nataatmadja, J. F. Fraser, M. Kempf, R. M. Kimble, and M. T. Hayes, Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization, *Wound Repair and Regeneration*, 13 (2005) 198-204.
- [43] J. F. Fraser, L. Cuttle, M. Kempf, G. E. Phillips, P. K. O'Rourke, K. Choo, M. T. Hayes, and R. M. Kimble, Deep dermal burn injury results in scarless wound healing in the ovine fetus, *Wound Repair and Regeneration*, 13 (2005) 189-197.
- [44] O. J. Lorenzet, R. Uberman, E. Busby, and B. Fortenbe, Influence of Microcrystalline Collagen on Wound-Healing .1. Wound Closure of Normal Excised and Burn Excised Wounds of Rats, Rabbits, and Pigs, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 140 (1972) 896-900.
- [45] N. I. Cruz, F. E. Bayron, and A. J. Suarez, Accelerated Healing of Full-Thickness Burns by the Use of High-Voltage Pulsed Galvanic Stimulation in the Pig, *Annals of Plastic Surgery*, 23 (1989) 49-55.
- [46] K. Breuing, E. Eriksson, P. Liu, and D. R. Miller, Healing of Partial Thickness Porcine Skin Wounds in A Liquid Environment, *Journal of Surgical Research*, 52 (1992) 50-58.
- [47] S. C. Davis, P. M. Mertz, and W. H. Eaglstein, 2Nd-Degree Burn Healing - the Effect of Occlusive Dressings and A Cream, *Journal of Surgical Research*, 48 (1990) 245-248.
- [48] A. J. Singer, L. Berrutti, H. C. Thode, and S. A. McClain, Octylcyanoacrylate for the treatment of partial-thickness burns in swine: A randomized, controlled experiment, *Academic Emergency Medicine*, 6 (1999) 688-692.
- [49] A. J. Singer, L. Berruti, H. C. Thode, and S. A. McClain, Standardized burn model using a multiparametric histologic analysis of burn depth, *Academic Emergency Medicine*, 7 (2000) 1-6.

- [50] A. J. Singer and S. A. McClain, The effects of a high-potency topical steroid on cutaneous healing of burns in pigs, *Academic Emergency Medicine*, 9 (2002) 977-982.
- [51] A. J. Singer, H. C. Thode, and S. A. McClain, The effects of octylcyanoacrylate on scarring after burns, *Academic Emergency Medicine*, 8 (2001) 107-111.
- [52] C. E. White and E. M. Renz, Advances in surgical care: Management of severe burn injury, *Critical Care Medicine*, 36 (2008) S318-S324.
- [53] S. E. Wolf, D. S. Kauvar, C. E. Wade, L. C. Cancio, E. P. Renz, E. E. Horvath, C. E. White, M. S. Park, S. Wanek, M. A. Albrecht, L. H. Blackbourne, D. J. Barillo, and J. B. Holcomb, Comparison between civilian burns and combat burns from operation Iraqi freedom and operation enduring freedom, *Annals of Surgery*, 243 (2006) 786-795.
- [54] R. Gomez, C. K. Murray, D. R. Hospenhal, L. C. Cancio, E. M. Renz, J. B. Holcomb, C. E. Wade, and S. E. Wolf, Causes of mortality by autopsy findings of combat casualties and civilian patients admitted to a burn unit, *J Am Coll Surg*, 208 (2009).
- [55] D. Heimbach, L. Engrav, B. Grube, and J. Marvin, Burn Depth - A Review, *World Journal of Surgery*, 16 (1992) 10-15.
- [56] Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures, www.sfetb.org, website, (2010).
- [57] C. Desouches, D. Wassermann, J. Gouvernet, M. Berret, J. C. Manelli, and G. Magalon, Influence des pathologies associées et de l'âge sur la mortalité des patients brûlés âgés de plus de 65ans., *Brûlures*, 1 (2000) 19-25.
- [58] K. Z. Shirani, B. A. Pruitt, and A. D. Mason, The Influence of Inhalation Injury and Pneumonia on Burn Mortality, *Annals of Surgery*, 205 (1987) 82-87.
- [59] C. P. Brandt, C. J. Yowler, and R. B. Fratianne, Burns with multiple trauma, *American Surgeon*, 68 (2002) 240-243.
- [60] R. S. Smith and C. P. Brandt, Burns with multiple trauma - Discussion, *American Surgeon*, 68 (2002) 243-244.
- [61] A. F. Falabella, Debridement and wound bed preparation, *Dermatol Ther.*, 19 (2006) 317-325.
- [62] S. Thomas, Wounds and wound healing, *Wound management and dressing*. 1st edition, 1990, pp. 1-14.
- [63] R. Vilain, *Jeux de mains*, Ed Arthaud, 1987.
- [64] J. C. J. Tanner, J. Vandeput, and J. F. Olley, The Mesh Skin Graft, *Plast Reconstr Surg*, 34 (1964) 287-293.
- [65] J. J. Vandeput, J. C. Tanner, and J. Bowick, Implementation of parameters in the expansion ratio of mesh skin grafts, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 100 (1997) 653-656.
- [66] A. C. Kudi, J. U. Umoh, L. O. Eduvie, and J. Gefu, Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 67 (1999) 225-228.

- [67] K. Inngjerdingen, C. S. Nergard, D. Diallo, P. P. Mounkoro, and B. S. Paulsen, An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa, *J Ethnopharmacol.*, 92 (2004) 233-244.
- [68] A. Y. Mensah, P. J. Houghton, R. A. Dickson, T. C. Fleischer, M. Heinrich, and P. Bremner, In vitro evaluation of effects of two Ghanaian plants relevant to wound healing, *Phytotherapy Research*, 20 (2006) 941-944.
- [69] L. Pasteur, La théorie des germes et ses applications à la médecine et à la chirurgie, *Bulletin de l'Académie de Médecine*, (1878).
- [70] van Rijswijk L., Ingredient-based wound dressing classification: a paradigm that is passé and in need of replacement, *J Wound Care*, 15 (2006) 11-14.
- [71] GM. Eccleston, Wound dressings, *Pharmaceutics : The science of dosage form design*. 3rd edition, 2007, pp. 264-271.
- [72] DA. Morgan, Wounds - What should a dressing formulary include?, *Hosp Pharmacist*, (2002) 261-266.
- [73] M. Rothe and V. Falanga, Growth-Factors - Their Biology and Promise in Dermatologic Diseases and Tissue-Repair, *Archives of Dermatology*, 125 (1989) 1390-1398.
- [74] A. Fukunaga, H. Naritaka, R. Fukaya, M. Tabuse, and T. Nakamura, Our method of povidone-iodine ointment and gauze dressings reduced catheter-related infection in serious cases, *Dermatology*, 212 Suppl 1 (2006) 47-52.
- [75] Ellis, Farstvedt, Ted S. Stashak, and Ashlee, Othic. Update on topical wound medications. 3[2], 164-172. 1-6-2004.
Ref Type: Abstract
- [76] C. Dealey, Role of hydrocolloids in wound management, *Br. J Nurs.*, 2 (1993) 358-362.
- [77] A. Misra and J. Nanchahal, Use of gauze soaked in povidone iodine for dressing acute open wounds, *Plast Reconstr. Surg.*, 111 (2003) 2105-2107.
- [78] V. J. Jones, The use of gauze: will it ever change?, *Int Wound J*, 3 (2006) 79-86.
- [79] F. Dinah and A. Adhikari, Gauze packing of open surgical wounds: empirical or evidence-based practice?, *Ann R. Coll. Surg. Engl.*, 88 (2006) 33-36.
- [80] K. Harding, K. Cutting, and P. Price, The cost-effectiveness of wound management protocols of care, *Br. J Nurs.*, 9 (2000) S6, S8, S10.
- [81] K. W. Chang, S. Alsagoff, K. T. Ong, and P. H. Sim, Pressure ulcers--randomised controlled trial comparing hydrocolloid and saline gauze dressings, *Med. J Malaysia*, 53 (1998) 428-431.
- [82] S. Thomas, Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature, *Int Wound J*, 5 (2008) 602-613.
- [83] M. J. Hoekstra, M. H. Hermans, C. D. Richters, and R. P. Dutrieux, A histological comparison of acute inflammatory responses with a hydrofibre or tulle gauze dressing, *J Wound Care*, 11 (2002) 113-117.

- [84] M. Walker, J. A. Hobot, G. R. Newman, and P. G. Bowler, Scanning electron microscopic examination of bacterial immobilisation in a carboxymethyl cellulose (AQUACEL) and alginate dressings, *Biomaterials*, 24 (2003) 883-890.
- [85] A. J. Nemeth, W. H. Eaglstein, J. R. Taylor, L. J. Peerson, and V. Falanga, Faster healing and less pain in skin biopsy sites treated with an occlusive dressing, *Arch. Dermatol*, 127 (1991) 1679-1683.
- [86] A. Heenan, Alginates: an effective primary dressing for exuding wounds, *Nurs. Stand.*, 22 (2007) 53-58.
- [87] C. K. Kuo and P. X. Ma, Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, 22 (2001) 511-521.
- [88] L. Wang, R. M. Shelton, P. R. Cooper, M. Lawson, J. T. Triffitt, and J. E. Barralet, Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering, *Biomaterials*, 24 (2003) 3475-3481.
- [89] S. Ichioka, K. Harii, M. Nakahara, and Y. Sato, An experimental comparison of hydrocolloid and alginate dressings, and the effect of calcium ions on the behaviour of alginate gel, *Scand. J Plast Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 32 (1998) 311-316.
- [90] R. J. Schmidt and T. D. Turner, Calcium alginate dressings, *Pharm. J.*, (1986) 236-278.
- [91] J. W. Doyle, T. P. Roth, R. M. Smith, Y. Q. Li, and R. M. Dunn, Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro, *J Biomed. Mater Res.*, 32 (1996) 561-568.
- [92] A. Thomas, K. G. Harding, and K. Moore, Alginates from wound dressings activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor-alpha, *Biomaterials*, 21 (2000) 1797-1802.
- [93] S. D. Blair, P. Jarvis, M. Salmon, and C. McCollum, Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs, *Br. J Surg.*, 77 (1990) 568-570.
- [94] S. D. Blair, C. M. Backhouse, R. Harper, J. Matthews, and C. N. McCollum, Comparison of absorbable materials for surgical haemostasis, *Br. J Surg.*, 75 (1988) 969-971.
- [95] M. S. Agren, Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds: a comparative experimental study, *Br. J Plast Surg.*, 49 (1996) 129-134.
- [96] K. Lay-Flurrie, The properties of hydrogel dressings and their impact on wound healing, *Prof. Nurse*, 19 (2004) 269-273.
- [97] A. Moody, Use of a hydrogel dressing for management of a painful leg ulcer, *British journal of community nursing*, 11 (2006) S12-S17.
- [98] J. B. Debra and O. Cheri, Wound healing : technological innovations and market overview, 1998.
- [99] V. Moshakis, M. J. Fordyce, J. D. Griffiths, and J. A. McKinna, Tegadern versus gauze dressing in breast surgery, *Br. J Clin. Pract.*, 38 (1984) 149-152.
- [100] S. Thomas and P. Loveless, Comparative review of the properties of six semipermeable film dressings, *Pharm. J.*, 240 (1988) 785-787.
- [101] R. H. Bartlett, Skin Substitutes, *The Journal of Trauma*, 21 (1981) 731-732.

- [102] J. A. Ramshaw, J. A. Werkmeister, and V. Glattauer, Collagen-based biomaterials, *Biotechnol. Genet. Eng Rev*, 13 (1996) 335-382.
- [103] C. J. Doillon and F. H. Silver, Collagen-based wound dressing: effects of hyaluronic acid and fibronectin on wound healing, *Biomaterials*, 7 (1986) 3-8.
- [104] M. Burkatovskaya, G. P. Tegos, E. Swietlik, T. N. Demidova, A. P. Castano, and M. R. Hamblin, Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice, *Biomaterials*, 27 (2006) 4157-4164.
- [105] M. Burkatovskaya, A. P. Castano, T. N. midova-Rice, G. P. Tegos, and M. R. Hamblin, Effect of chitosan acetate bandage on wound healing in infected and noninfected wounds in mice, *Wound Repair and Regeneration*, 16 (2008) 425-431.
- [106] T. H. Dai, G. P. Tegos, M. Burkatovskaya, A. P. Castano, and M. R. Hamblin, Chitosan Acetate Bandage as a Topical Antimicrobial Dressing for Infected Burns, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2009) 393-400.
- [107] Y. Okamoto, K. Shibazaki, S. Minami, A. Matsushashi, S. Tanioka, and Y. Shigemasa, Evaluation of Chitin and Chitosan on Open Wound-Healing in Dogs, *Journal of Veterinary Medical Science*, 57 (1995) 851-854.
- [108] H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, T. Kadosawa, and T. Fujinaga, Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *Biomaterials*, 20 (1999) 1407-1414.
- [109] K. P. Rao, Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems, *J Biomater. Sci Polym. Ed*, 7 (1995) 623-645.
- [110] P. Tewes-Schwarzer, Manufacturing principles of freeze-dried collagen sponges : characteristics and applications, *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 96 (1999) 359-372.
- [111] Z. Ruszczak and W. Friess, Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev*, 55 (2003) 1679-1698.
- [112] K. P. Vercruysse and G. D. Prestwich, Hyaluronate derivatives in drug delivery, *Crit Rev Ther. Drug Carrier Syst.*, 15 (1998) 513-555.
- [113] Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery, *J Control Release*, 69 (2000) 169-184.
- [114] V. Voinchet, P. Vasseur, and J. Kern, Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds, *Am. J Clin. Dermatol*, 7 (2006) 353-357.
- [115] L. C. OLIVER and G. BLAINE, Haemostasis with absorbable alginates in neurosurgical practice, *Br. J Surg.*, 37 (1950) 307-310.
- [116] B. A. Pruitt, Jr. and N. S. Levine, Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes, *Arch. Surg.*, 119 (1984) 312-322.
- [117] S. T. Andreadis and D. J. Geer, Biomimetic approaches to protein and gene delivery for tissue regeneration, *Trends Biotechnol.*, 24 (2006) 331-337.
- [118] R. E. Horch, J. Kopp, U. Kneser, J. Beier, and A. D. Bach, Tissue engineering of cultured skin substitutes, *J Cell Mol. Med.*, 9 (2005) 592-608.

- [119] M. J. Whitaker, R. A. Quirk, S. M. Howdle, and K. M. Shakesheff, Growth factor release from tissue engineering scaffolds, *J Pharm. Pharmacol.*, 53 (2001) 1427-1437.
- [120] D. M. Supp and S. T. Boyce, Engineered skin substitutes: practices and potentials, *Clin. Dermatol*, 23 (2005) 403-412.
- [121] M. V. Sefton and K. A. Woodhouse, Tissue engineering, *J Cutan. Med. Surg.*, 3 Suppl 1 (1998) S1-23.
- [122] Z. Ruzczak, Effect of collagen matrices on dermal wound healing, *Adv. Drug Deliv. Rev*, 55 (2003) 1595-1611.
- [123] G. A. F. Roberts, chitin chemistry, MacMillan Press Ltd, 1992.
- [124] C. Jeuniaux, M. F. Voss-Foucart, M. Poulícek, and J. C. Bussers, Sources of chitin, estimated from new data on chitin biomass production, in: Elsevier (London) (Ed.), *Chitin and chitosan*, 1989, pp. 3-11.
- [125] A. Domard, Physicochemical properties of chitinous materials, *Adv. Chitin Sci.*, 3 (1998) 24-38.
- [126] S. Minami, M. Oh-oka, Y. Okamoto, K. Miyatake, A. Matsuhashi, Y. Shigemasa, and Y. Fukumoto, Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs, *Carbohydrate Polymers*, 29 (1996) 241-246.
- [127] S. B. Rao and C. P. Sharma, Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential, *J Biomed. Mater Res.*, 34 (1997) 21-28.
- [128] C. Chatelet, O. Damour, and A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22 (2001) 261-268.
- [129] L. Valenti, J. Mathieu, Y. Chancerelle, M. Levacher, B. Chanaud, M. De Sousa, S. Strzalko, A. T. nh-Xuan, J. P. Giroud, and I. Florentin, Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury by inducing cytostasis, apoptosis, and necrosis of activated T lymphocytes: role of the guanylate cyclase, *Cellular Immunology*, 221 (2003) 50-63.
- [130] P. Lestaavel, D. Agay, A. Peinnequin, C. Cruz, R. Cespuglio, D. Clarencon, E. Multon, and Y. Chancerelle, Effects of a thermal injury on brain and blood nitric oxide (NO) content in the rat, *Burns*, 29 (2003) 557-562.
- [131] S. Hirano, H. Tsuchida, and N. Nagao, N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis, *Biomaterials*, 10 (1989) 574-576.
- [132] G. Paradossi, E. Chiessi, M. Venanzi, B. Pispisa, and A. Palleschi, Branched-chain analogues of linear polysaccharides: a spectroscopic and conformational investigation of chitosan derivatives, *Int J Biol. Macromol.*, 14 (1992) 73-80.
- [133] K. Y. Lee, W. S. Ha, and W. H. Park, Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives, *Biomaterials*, 16 (1995) 1211-1216.
- [134] K. Kamiyama, H. Onishi, and Y. Machida, Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 22 (1999) 179-186.

- [135] C. Aimin, H. Chunlin, B. Juliang, Z. Tinyin, and D. Zhichao, Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis, *Clin. Orthop. Relat Res.*, (1999) 239-247.
- [136] E. J. Jung, D. K. Youn, S. H. Lee, H. K. No, J. G. Ha, and W. Prinyawiwatukul, Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities, *International Journal of Food Science and Technology*, 45 (2010) 676-682.
- [137] H. K. No, N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyers, Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights, *International Journal of Food Microbiology*, 74 (2002) 65-72.
- [138] D. H. Young and H. Kauss, Release of Calcium from Suspension-Cultured Glycine-Max Cells by Chitosan, Other Polycations, and Polyamines in Relation to Effects on Membrane-Permeability, *Plant Physiology*, 73 (1983) 698-702.
- [139] D. H. Young, H. Kohle, and H. Kauss, Effect of Chitosan on Membrane-Permeability of Suspension-Cultured Glycine-Max and Phaseolus-Vulgaris Cells, *Plant Physiology*, 70 (1982) 1449-1454.
- [140] E. I. Rabea, M. E. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut, Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 1457-1465.
- [141] Y. J. Jeon, P. J. Park, and S. K. Kim, Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, *Carbohydrate Polymers*, 44 (2001) 71-76.
- [142] L. Y. Zheng and J. A. F. Zhu, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers*, 54 (2003) 527-530.
- [143] S. P. Strand, M. S. Vandvik, K. M. Varum, and K. Ostgaard, Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation, *Biomacromolecules*, 2 (2001) 126-133.
- [144] J. K. Suh and H. W. Matthew, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21 (2000) 2589-2598.
- [145] T. Kosaka, Y. Kaneko, Y. Nakada, M. Matsuura, and S. Tanaka, Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress, *Journal of Veterinary Medical Science*, 58 (1996) 963-967.
- [146] P. H. Schlesinger, J. S. Rodman, T. W. Doebber, P. D. Stahl, Y. C. Lee, C. P. Stowell, and T. B. Kuhlenschmidt, The Role of Extra-Hepatic Tissues in the Receptor-Mediated Plasma-Clearance of Glycoproteins Terminated by Mannose Or N-Acetylglucosamine, *Biochemical Journal*, 192 (1980) 597-606.
- [147] G. A. Warr, A Macrophage Receptor for "(Mannose-Glucosamine)-Glycoproteins of Potential Importance in Phagocytic-Activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93 (1980) 737-745.
- [148] V. L. Shepherd, E. J. Campbell, R. M. Senior, and P. D. Stahl, Characterization of the Mannose Fucose Receptor on Human Mononuclear Phagocytes, *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 32 (1982) 423-431.

- [149] G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosio, D. Calabro, B. Avallone, and G. Balsamo, Chitosan-Mediated Stimulation of Macrophage Function, *Biomaterials*, 15 (1994) 1215-1220.
- [150] L. A. Dipietro, Wound-Healing - the Role of the Macrophage and Other Immune Cells, *Shock*, 4 (1995) 233-240.
- [151] K. Nishimura, C. Ishihara, S. Ukei, S. Tokura, and I. Azuma, Stimulation of Cytokine Production in Mice Using Deacetylated Chitin, *Vaccine*, 4 (1986) 151-156.
- [152] H. Ueno, F. Nakamura, M. Murakami, M. Okumura, T. Kadosawa, and T. Fujinaga, Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages, *Biomaterials*, 22 (2001) 2125-2130.
- [153] T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami, and T. Fujinaga, Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, 18 (1997) 947-951.
- [154] A. Denuziere, D. Ferrier, O. Damour, and A. Domard, Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties, *Biomaterials*, 19 (1998) 1275-1285.
- [155] J. M. Guenet, *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers*, Academic Press, Londres, (1992).
- [156] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, and R. Gurny, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (2004) 19-34.
- [157] A. Berthold, K. Cremer, and J. Kreuter, Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs, *Journal of Controlled Release*, 39 (1996) 17-25.
- [158] X. Z. Shu and K. J. Zhu, Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure, *International Journal of Pharmaceutics*, 233 (2002) 217-225.
- [159] K. I. Draget, K. M. Varum, E. Moen, H. Gynnild, and O. Smidsrod, Chitosan Cross-Linked with Mo(VI) Polyoxyanions - A New Gelling System, *Biomaterials*, 13 (1992) 635-638.
- [160] L. Dambies, T. Vincent, A. Domard, and E. Guibal, Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation, *Biomacromolecules*, 2 (2001) 1198-1205.
- [161] H. P. Brack, S. A. Tirmizi, and W. M. Risen, A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan, *Polymer*, 38 (1997) 2351-2362.
- [162] J. Y. Cho, M. C. Heuzey, A. Begin, and P. J. Carreau, Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry, *Food Hydrocolloids*, 20 (2006) 936-945.
- [163] F. L. Mi, S. S. Shyu, T. B. Wong, S. F. Jang, S. T. Lee, and K. T. Lu, Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent, *Journal of Applied Polymer Science*, 74 (1999) 1093-1107.

- [164] F. L. Mi, S. S. Shyu, S. T. Lee, and T. B. Wong, Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 37 (1999) 1551-1564.
- [165] X. Shu and K. J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 201 (2000) 51-58.
- [166] P. Calvo, C. RemunanLopez, J. L. VilaJato, and M. J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *Journal of Applied Polymer Science*, 63 (1997) 125-132.
- [167] R. Bodmeier, H. G. Chen, and O. Paeratakul, A Novel-Approach to the Oral Delivery of Micro-Particles or Nanoparticles, *Pharmaceutical Research*, 6 (1989) 413-417.
- [168] H. J. Kim, H. C. Lee, J. S. Oh, B. A. Shin, C. S. Oh, R. D. Park, K. S. Yang, and C. S. Cho, Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 10 (1999) 543-556.
- [169] K. D. Yao, H. L. Tu, F. Cheng, J. W. Zhang, and J. Liu, pH-sensitivity of the swelling of a chitosan-pectin polyelectrolyte complex, *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 245 (1997) 63-72.
- [170] L. Rusu-Balaita, J. Desbrieres, and M. Rinaudo, Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability, *Polymer Bulletin*, 50 (2003) 91-98.
- [171] A. Drogoz, L. David, C. Rochas, A. Domard, and T. Delair, Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: Formation and stoichiometry monitoring, *Langmuir*, 23 (2007) 10950-10958.
- [172] C. Schatz, J. M. Lucas, C. Viton, A. Domard, C. Pichot, and T. Delair, Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers, *Langmuir*, 20 (2004) 7766-7778.
- [173] M. N. Taravel and A. Domard, Collagen and its interactions with chitosan .3. Some biological and mechanical properties, *Biomaterials*, 17 (1996) 451-455.
- [174] M. N. Taravel and A. Domard, Collagen and Its Interaction with Chitosan .2. Influence of the Physicochemical Characteristics of Collagen, *Biomaterials*, 16 (1995) 865-871.
- [175] M. N. Taravel and A. Domard, Relation Between the Physicochemical Characteristics of Collagen and its Interactions with Chitosan :1., *Biomaterials*, 14 (1993) 930-938.
- [176] G. Borchard, Chitosans for gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52 (2001) 145-150.
- [177] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomaterials*, 26 (2005) 933-943.
- [178] G. Chaussard, Elaboration et étude de matériaux innovants pour la reconstruction cellulaire., Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, (2002).
- [179] N. Boucard, C. Viton, and A. Domard, New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 3227-3237.

- [180] N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard, The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns, *Biomaterials*, 28 (2007) 3478-3488.
- [181] A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. T. Corvol, and A. Domard, A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering, *Biochimie*, 88 (2006) 551-564.
- [182] S. Ladet, L. David, and A. Domard, Multi-membrane hydrogels, *Nature*, 452 (2008) 76-79.
- [183] J. L. Drury and D. J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials*, 24 (2003) 4337-4351.
- [184] R. Langer and N. A. Peppas, Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology, *Aiche Journal*, 49 (2003) 2990-3006.
- [185] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 27-46.
- [186] A. S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002) 3-12.

Chapitre 2 : démarche expérimentale et protocoles

Le travail de thèse a débuté en Octobre 2006. Ce projet a vu le jour suite aux résultats obtenus au laboratoire lors de la thèse de N. Vizio-Boucard qui portait sur l'élaboration d'hydrogels physiques de chitosane. Au cours de ces travaux le mécanisme de formation des hydrogels physiques ainsi que leurs propriétés mécaniques ont été largement étudiés, et une première étude in-vivo de cicatrisation a pu montrer que les hydrogels développés au laboratoire permettent la reconstruction d'un tissu complexe proche du tissu natif. Bien que les effets angiogéniques et inflammatoires des hydrogels aient été mis en évidence au cours de ce travail, le mécanisme d'action et la nature des interactions biologiques n'ont pas été identifiés.

L'objectif du second projet a donc été de procéder à de nouvelles expérimentations in-vivo afin de confirmer l'intérêt des hydrogels pour la cicatrisation cutanée après brûlure du 3^{ème} degré, à travers notamment une expérimentation animale de longue durée, permettant d'étudier la qualité du tissu reconstruit à plus long terme. Enfin un autre objectif était d'étudier les mécanismes biologiques mis en jeu lors de la cicatrisation en présence de chitosane. En effet à la suite du travail de N. Vizio-Boucard, un certain nombre de questions ont été soulevées : comment le tissu cicatriciel évolue-t-il dans l'année qui suit la brûlure ? Dans quelle mesure peut-on dire qu'il s'agit d'un tissu de qualité, d'un point de vue mécanique notamment ? Et enfin N. Vizio-Boucard a observé que les hydrogels n'étaient jamais colonisés par les cellules cutanées, quels mécanismes biologiques expliquent alors la qualité du tissu reconstruit en présence de chitosane et selon quel type d'interactions ?

La première partie de la thèse s'est donc articulée autour d'une expérimentation animale qui a duré une année complète (E1). Cette expérimentation menée chez le porc nain nous a permis d'étudier la cicatrisation de brûlures du 3^{ème} degré en présence d'hydrogels physiques bicouche de chitosane, avec pour plaies témoins les mêmes brûlures soignées à l'aide de Tulle Gras. Ce travail a été rendu possible grâce à la collaboration entre l'équipe du LMPB/IMP pour l'élaboration des dispositifs hydrogels, celle du CRSSA (Yves Chancerelle et Diane Agay) et celle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Claude Carozzo, Didier Pin, Thierry Roger) qui ont conçu le protocole d'évaluation biologique et pris en charge les soins

apportés aux animaux, la chirurgie, le suivi échographique et surtout l'étude histologique des tissus natifs et reconstruits.

Dans le cadre de cette expérimentation, nous avons choisi d'étudier la qualité du tissu cicatriciel d'un point de vue structural grâce aux techniques de microscopie électronique en transmission (MET), de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et enfin d'un point de vue mécanique grâce à des essais de traction in et ex vivo, réalisés également sous faisceau synchrotron en ce qui concerne les études ex vivo.

Par ailleurs dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Benoît Chevalier, médecin en chef au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes, nous avons procédé à l'évaluation des propriétés antibactériennes du chitosane sous la forme d'hydrogels tels que nous les avons utilisés au cours de cette étude. Ce travail a été réalisé avec Mlle Lucie Enjalran dans le cadre de sa thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie.

Une deuxième expérimentation (E2) a été mise en place parallèlement à la première afin d'optimiser le protocole d'étude de la peau sous faisceau synchrotron.

L'objectif était de valider le protocole expérimental, notamment l'influence du temps et des conditions de conservation des prélèvements. Ainsi nous avons choisi d'étudier ces paramètres au cours d'une étude de faisabilité (E2) menée sur un animal ne faisant pas partie de notre étude de cicatrisation. Pour cela nous avons réalisés plusieurs séries de biopsies sur le dos d'un jeune porc charcutier, et avons fait varier leurs conditions de conservation avant de les observer sous faisceau.

Enfin l'étude des résultats obtenus au cours de l'expérimentation (E1) a motivé la mise en place d'une troisième et dernière expérimentation animale (E3), menée chez deux porcs charcutiers. Il s'agissait cette fois d'étudier précisément les mécanismes d'action biologique du chitosane au cours du premier mois de cicatrisation, afin d'établir un « scénario » des interactions cellules/tissus-hydrogel de chitosane.

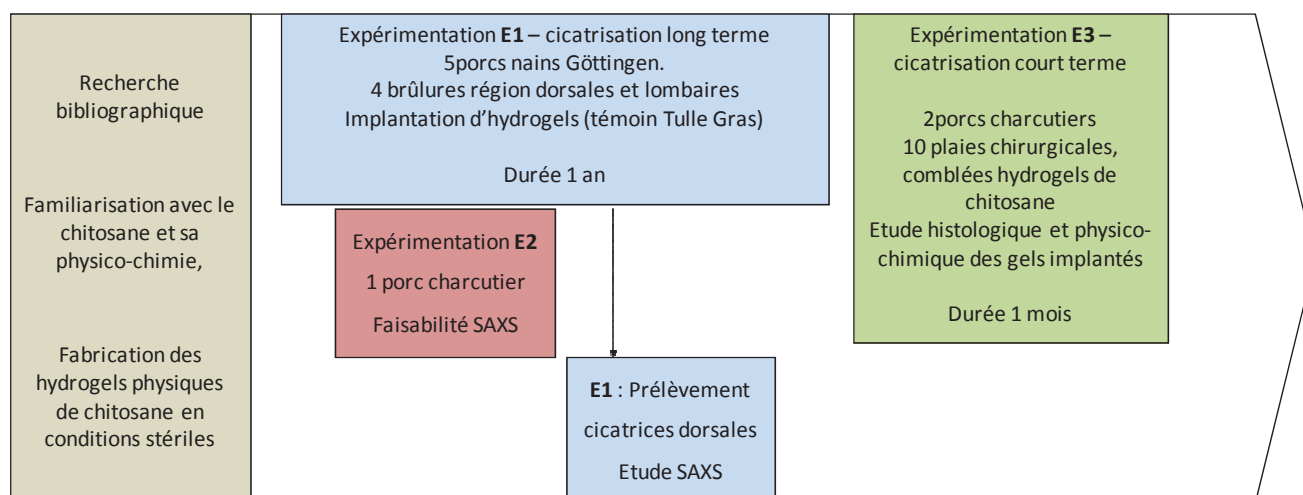


Figure 14 : chronologie des expérimentations réalisées

Après ces quelques rappels d'ordre chronologique, les différents protocoles ayant été mis en place au cours du projet seront décrits précisément.

1^{ère} partie : élaboration des hydrogels de chitosane

La production d'hydrogels bicouches de chitosane est basée sur la combinaison de deux procédés de gélification distincts (*figure 15*), précédemment mis au point au laboratoire IMP/LMPB [1-3].

Le premier, que l'on appellera « procédé par voie hydroalcoolique », est basé sur l'évaporation à une température de 50°C d'une solution hydroalcoolique de chitosane de composition initiale eau/alcool 50/50 (% en masse). La différence de température d'ébullition entre l'eau et le 1,2 propanediol (188°C) conduit à l'évaporation de l'eau en premier lieu. La présence d'alcool diminue la constante diélectrique du milieu ce qui a pour effet de modifier la balance hydrophile/hydrophobe de la solution. La perturbation du milieu favorise la formation de liaisons hydrogène et hydrophobes entre les chaînes, conduisant à la formation d'un réseau physique tridimensionnel, neutralisé par la suite à l'aide de vapeur d'ammoniac. Le gel obtenu est alors stable et peut-être lavé à l'eau afin d'éliminer les résidus d'ammoniac et de sels, pour ne contenir au final que du chitosane et de l'eau.

Le deuxième procédé que l'on appellera « procédé par voie aqueuse », consiste à mettre en contact une solution aqueuse de chitosane avec des vapeurs d'ammoniac. La gélification est obtenue du fait de la modification de l'état d'ionisation du polymère, puisque les charges limitent les associations inter-chaînes et favorisent la solubilité. Sur le plan du mécanisme, la gélification est due à la formation de nano-objets obtenus à partir d'interactions hydrophobes [4]. La formation de ces nano-objets ne peut cependant conduire à la formation d'un gel, c'est-à-dire à un ensemble de particules enchevêtrées, que si la concentration en polymère dépasse une certaine concentration : au dessous d'un certain seuil, on forme un précipité donc les caractéristiques mécaniques sont très faibles, ou encore un colloïde dont les applications dépassent le cadre de ce travail.

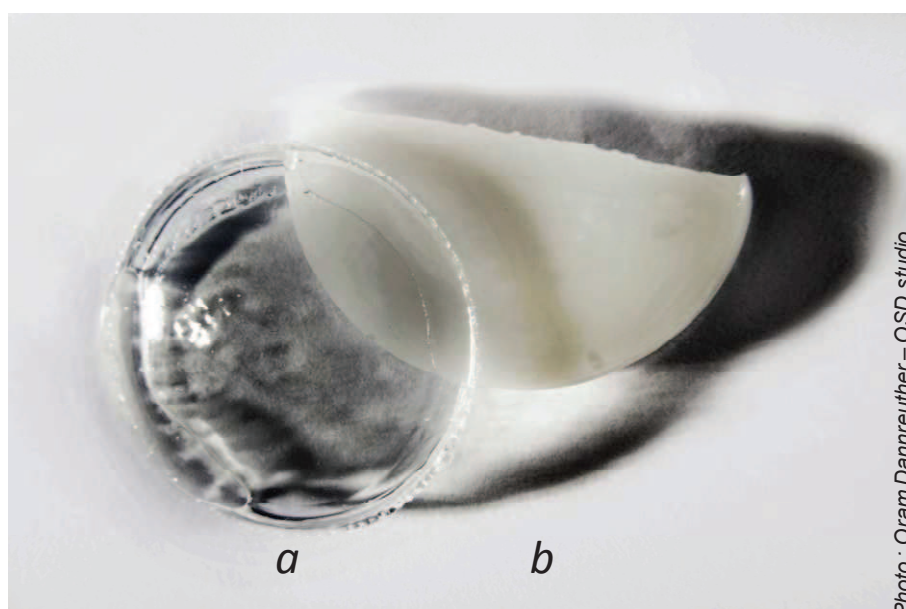


Figure 15 : Hydrogels physiques de chitosane obtenus par la voie hydroalcoolique (a) et aqueuse (b)

1. Purification et stérilisation du chitosane

Nous avons utilisé du chitosane issu de plumes de calamar (Mahtani, lot 113). Afin de le purifier, il a été dissout (0.5% en masse) en présence de la quantité d'acide acétique nécessaire à la protonation stœchiométrique des sites $-NH_2$. La solution obtenue a été filtrée sur des membranes de filtration Millipore (3, 1.2 et 0.45 μ m). Le polymère est ensuite précipité par l'addition d'ammoniaque concentré à 28% en masse. Après plusieurs cycles de lavages/centrifugations jusqu'à l'obtention d'un pH neutre, le chitosane est lyophilisé. Le

produit obtenu est un chitosane de bas DA (1.5%) et de haute masse moléculaire (M_w proche de $500\,000\text{ g.mol}^{-1}$ $\pm 50\,000\text{ g.mol}^{-1}$) dont la teneur en eau est d'environ 9% w/w $\pm 1\%$.

Destinés à être implantés sur des plaies chirurgicales, les hydrogels de chitosane doivent être soumis à un traitement stérilisant. Les principaux procédés de stérilisation employés pour les dispositifs médicaux et pharmaceutiques sont la chaleur sèche, la vapeur d'eau, l'oxyde d'éthylène et le rayonnement gamma. Lim et coll. ont montré que la stérilisation par chaleur sèche diminue la solubilité du chitosane, phénomène également observé après une stérilisation à la vapeur, et accompagné dans ce dernier cas d'une chute importante des propriétés mécaniques des membranes de chitosane testées[5]. Par ailleurs Lim et coll. ont conclu à la suite d'une autre étude que les rayons gamma, en dépit d'un grand nombre de ruptures de chaînes polymères et d'une importante dégradation des propriétés mécaniques, constitue le meilleur procédé de stérilisation pour le chitosane[6]. Ces conclusions sont en contradiction avec celles de Rao et coll. et celles de Jarry et coll. qui préconisent la méthode de stérilisation à la vapeur d'eau.

Plusieurs auteurs décrivent un jaunissement du chitosane lors de stérilisation à la vapeur ou aux rayons gamma [7,8].

Les avis divergent concernant le meilleur procédé pour stériliser le chitosane, mais il faut garder à l'esprit que dans le cas de la stérilisation d'un dispositif médical, la biocompatibilité et la non-toxicité sont des propriétés qui doivent être absolument préservées. Or l'oxyde d'éthylène est un produit dangereux, toxique et son utilisation peut conduire à la contamination du matériau par des résidus d'oxyde d'éthylène. D'autre part les rayons gamma induisent des modifications structurales importantes, notamment la rupture des chaînes polymères au niveau de la liaison $\beta_{1\rightarrow4}$. Il a été montré que l'irradiation gamma conduit à une diminution du DA, ce qui implique une rupture au niveau des groupes acétyles, conduisant à une dégradation significative du chitosane, et donc à une modification de ses propriétés biologiques. Cette technique entraîne une chute de la masse molaire telle que la formation d'hydrogels n'est plus possible.

La technique que nous avons donc choisie pour nos dispositifs implantables est la stérilisation à la vapeur d'eau, en autoclave. Afin de limiter la diminution de la masse molaire

du chitosane dans le cadre de la fabrication des hydrogels, nous avons choisi de stériliser le chitosane sous sa forme lyophilisée initiale (après purification), d'après les résultats obtenus par Boucard et coll. qui ont montré que la masse molaire était plus affectée par le processus de stérilisation lors de la stérilisation des solutions et des gels de chitosane que lors de la stérilisation de la forme solide[9]. Le chitosane lyophilisé a ainsi été placé dans des sachets, en double-emballage, puis soumis à un cycle d'autoclave de 20minutes à 121°C, comme préconisé par Boucard et coll.

L'ensemble du matériel et des instruments nécessaires à la fabrication des hydrogels a également été stérilisé par autoclave avant d'être introduit sous une hotte à flux laminaire. La stérilité du système est ensuite garantie par le flux laminaire tout au long des étapes de fabrication.

2. Procédé de fabrication des hydrogels bicouches

Une solution aqueuse de chitosane concentrée à 3% en masse est préparée sous la hotte à flux laminaire à partir du chitosane précédemment purifié et stérilisé, d'eau permutée stérile et de la quantité d'acide chlorhydrique (37% en masse) nécessaire pour atteindre la protonation de tous les sites $-NH_2$. La dissolution est complète après 8 heures sous agitation.

On obtient alors une solution hydroalcoolique de chitosane en ajoutant du 1,2-propanediol à cette solution aqueuse, avec un ratio 1/1. Lorsque la solution hydroalcoolique est homogène, celle-ci est versée dans une boîte de Pétri puis placée à l'étuve à 50°C. Après environ 48h, l'eau contenue dans le mélange est complètement évaporée (ce qui correspond à une chute de masse de 50%), et on obtient alors un gel alcoolique.

La seconde couche du système est obtenue par l'ajout sur ce gel alcoolique d'une solution aqueuse de chitosane (3% en masse), obtenue comme précédemment par dissolution du chitosane dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique.

Finalement on place la boîte de pétri contenant les deux couches dans une atmosphère chargée en vapeur d'ammoniac, capable de diffuser à travers la solution d'une part et l'alcool d'autre part. Ceci conduit à la gélification de la couche aqueuse et à la neutralisation des fonctions amines libres. (*figure 16*)

Plusieurs lavages du gel bicouche à l'eau permutée stérile permettent alors d'éliminer le propanediol, le chlorure d'ammonium formé et l'excès d'ammoniaque.

Le dispositif final obtenu est composé de deux couches ne contenant que du chitosane et de l'eau. La couche obtenue par voie hydroalcoolique confère au système de bonnes propriétés mécaniques et une réserve d'eau tandis que la seconde couche, plus souple, jouera le rôle d'interface bioactive avec la plaie. L'assemblage des deux gels est assuré par l'interdiffusion des chaînes polymères entre la solution et le gel alcoolique, en effet au contact de la solution, une partie de l'alcogel se dissout sous forme de solution hydroalcoolique.

Les hydrogels bicouches ainsi produits (*figure 17*) sont ensuite conservés dans des flacons stériles d'eau permutée jusqu'à l'implantation.

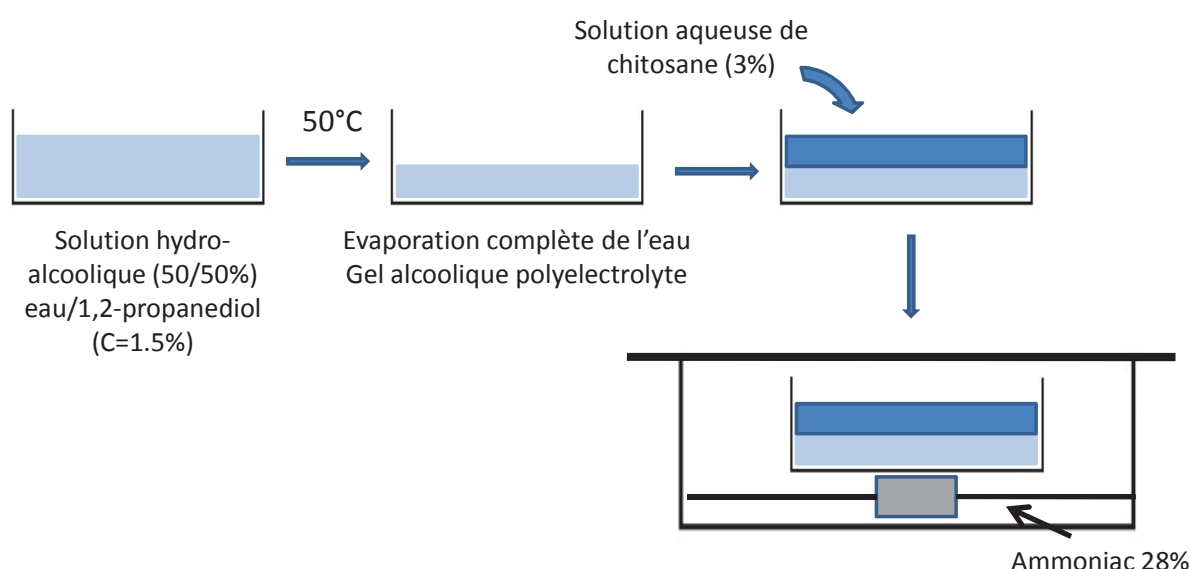


Figure 16 : Fabrication d'un hydrogel bicouche de chitosane

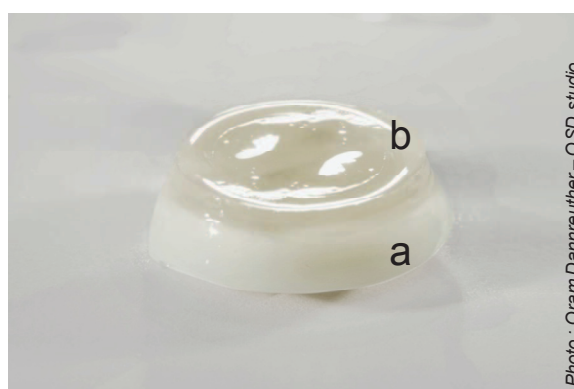


Figure 17 : hydrogel physique bicouche de chitosane. (a): phase destinée à être en contact avec la plaie, (b): couche externe

3. Evaluation des propriétés antibactériennes des hydrogels

Bien que les propriétés antibactériennes du chitosane soient largement documentées dans la littérature du fait de ses nombreuses applications dans les domaines pharmaceutique, agro-alimentaire et biomédical, le plus souvent les études sont conduites en solution, et donc dans des conditions de pH acide. Il est donc délicat de savoir si l'activité antibactérienne observée est-elle due au chitosane lui-même ou à l'acidité du milieu. Pourtant il s'agit là d'une information de grande importance dans le cadre du développement d'un dispositif cicatrisant pour le soin des brûlures. En effet les brûlés sont des patients susceptibles d'être très rapidement infectés et de façon massive du fait de la disparition de la couverture cutanée jouant un rôle essentiel de barrière, et aussi du fait de l'immunodépression sévère qui se développe.

Il nous est donc apparu important d'évaluer *in vitro* cette activité dans des conditions de pH proches de la neutralité, conditions dans lesquelles nos hydrogels sont stables.

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquide et solide. Les milieux liquides sont utilisés pour la culture de bactéries pures ou lors d'infections microbiennes (culture dans un bouillon nutritif ou encore à partir du sang d'un patient par exemple, on parle alors d'hémoculture). Les milieux solides ou semi-solides, à base d'agar (gélose), sont utilisés pour l'isolement et le comptage. Dans ces milieux sont ajoutés des nutriments favorisant la croissance des bactéries étudiées.

Afin de procéder à une culture bactérienne en milieu liquide et à pH proche de la neutralité, nous avons choisi de travailler à partir de broyats d'hydrogels, dispersés dans le milieu de culture. Ainsi l'effet bactériostatique évalué est celui des dispositifs eux-mêmes.

3.1 Choix du milieu de culture

Un milieu de culture est composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, sucres, etc), d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH, de sels minéraux et de vitamines. Il est possible d'ajouter des facteurs de croissance.

Le milieu de culture qui a été choisi est le bouillon de culture Brain-Heart. Il s'agit d'un bouillon d'usage courant qui convient à la culture de germes exigeants. Il est composé principalement d'infusion de cervelle de veau (12.5 g.L^{-1}), d'infusion de cœur de bœuf (5.0 g.L^{-1}), de protéose-peptone (10.0 g.L^{-1}), de glucose (2.0 g.L^{-1}), de chlorure de sodium (5.0 g.L^{-1}), de phosphate disodique (2.5 g.L^{-1}) et d'eau. Le pH du milieu est de 7.4 (+/- 0.2).

Les infusions d'organes sont riches en éléments nutritifs, permettant une croissance rapide des bactéries. L'apparition d'une turbidité dans ce milieu, initialement limpide et légèrement brunâtre, témoigne en général d'une croissance bactérienne.

3.2 Préparation des broyats d'hydrogels

Les dispositifs implantés au cours des expérimentations (E1) et (E3) sont des hydrogels bicouches de chitosane. La couche de gel en contact avec la plaie étant un hydrogel obtenu par la « voie aqueuse », nous avons choisi dans le cadre de l'étude bactériologique de travailler avec une dispersion d'hydrogel obtenu par ce procédé.

En pratique, nous avons procédé comme décrit précédemment : une solution aqueuse de chitosane à 3% en masse de polymère a été préparée en conditions stériles à l'aide de la quantité stoechiométrique d'acide chlorhydrique nécessaire à la protonation des sites -NH_2 et donc à la complète dissolution du chitosane. Cette solution concentrée a ensuite été placée dans une atmosphère saturée en vapeur d'ammoniaque. Les gels obtenus ont ensuite été lavés plusieurs fois à l'eau permutée stérile afin d'éliminer l'excès d'ammoniaque ainsi que les sels résiduels de chlorhydrate d'ammonium.

Toujours sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérile, nous avons procédé à la dispersion de broyats d'hydrogels dans le milieu Brain-Heart précédemment décrit.

4g d'hydrogels ont été broyés dans 12mL de milieu de culture à l'aide d'un disperseur Polytron® PT 2100 (KINEMATICA), équipé d'une tige de dispersion S25N-18G (IKA). On atteint ainsi une concentration finale en chitosane de 1% en masse dans le bouillon. L'opération a été répétée 30 fois, de manière à obtenir au total 40 tubes de culture contenant 9mL de dispersion.

3.3 Choix des bactéries

Nous avons choisi d'étudier des bactéries rencontrées couramment et pouvant donc constituer des pathogènes potentiels lors de plaies ou de brûlures profondes : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -) d'une part, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* (Gram +) d'autre part.

Escherichia coli (souche CIP 7624)

Egalement appelée colibacille, il s'agit d'une bactérie du tube digestif des mammifères très communes chez l'être humain. C'est une bactérie commensale, c'est-à-dire que l'hôte lui fournit sa nourriture sans contrepartie mais toutefois sans préjudice, qui peut être cependant à l'origine de diverses pathologies, tant chez l'homme que chez l'animal (diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires, méningites, septicémies,...)

Pseudomonas aeruginosa (CIP 76110)

Pseudomonas aeruginosa, ou bacille pyocyanique, est un saprophyte de l'environnement (c'est-à-dire une bactérie qui se nourrit de matière organique en décomposition), vivants dans les sols et les milieux humides (robinets, bouchons,...). Elle est pathogène et très résistante, une des plus difficiles à traiter cliniquement et de plus en plus souvent responsable de maladies nosocomiales, qui s'avèrent mortelles dans le cas de patients immunodéprimés.

Les formes de pathologies qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil et des plaies (surtout s'il s'agit de brûlures ou de plaies chirurgicales), méningites, surinfection des bronches dans la mucoviscidose. Elle induit facilement des infections systémiques chez les personnes immunodéprimées et chez les victimes de brûlures.

Staphylococcus aureus (souche ATCC 7625)

Plus connue sous le nom de staphylocoque doré, c'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses. Elle se révèle être un pathogène opportuniste dans certaines circonstances, et très invasif (multiplication rapide et dissémination dans l'organisme pouvant conduire à une septicémie). Elle agit également par libération d'une ou plusieurs

toxines (hémolysine, leucocidine, exfoliatine, enterotoxine,...) lors d'intoxications alimentaires par exemple.

C'est un germe responsable de la suppuration, qui a la capacité de développer des résistances aux antibiotiques, de ce fait il partage avec *Pseudomonas aeruginosa* le premier rôle dans les infections hospitalières.

Enterococcus faecalis (souche CIP 103214)

C'est une bactérie commensale du tube digestif des mammifères pouvant causer des infections mortelles. Son haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques la rend dangereuse, particulièrement en milieu hospitalier.

E. faecalis peut causer des endocardites, des infections de la vessie et de la prostate.

Ces quatre souches bactériennes ont été choisies en raison de leur caractère pathogène pouvant être responsable d'infections dans le cas de plaies ou brûlures profondes. On notera que *P.aeruginosa*, saprophyte de l'environnement, et *S.aureus*, commensale de la peau sont responsables de suppuration si elles sont présentes dans une blessure. *E.coli* et *E.faecalis* étant des bactéries du tube digestif, la contamination des plaies par ces pathogènes est moins fréquente dans la vie de tous les jours mais pourrait être représentative de conditions de vie où les conditions d'hygiène ne peuvent être maintenues.

3.4 Protocole mis en œuvre

Il faut distinguer deux étapes dans le protocole réalisé :

- la culture des souches bactériennes
- la numération, à différents temps de culture

Culture des souches bactériennes

Quelques colonies de bactéries provenant d'une culture fraîche des quatre souches ont été mises en suspension dans un bouillon Brain-Heart. La croissance bactérienne en milieu adapté et non renouvelé en nutriments se déroule en six phases, décrites par la *figure 18*.

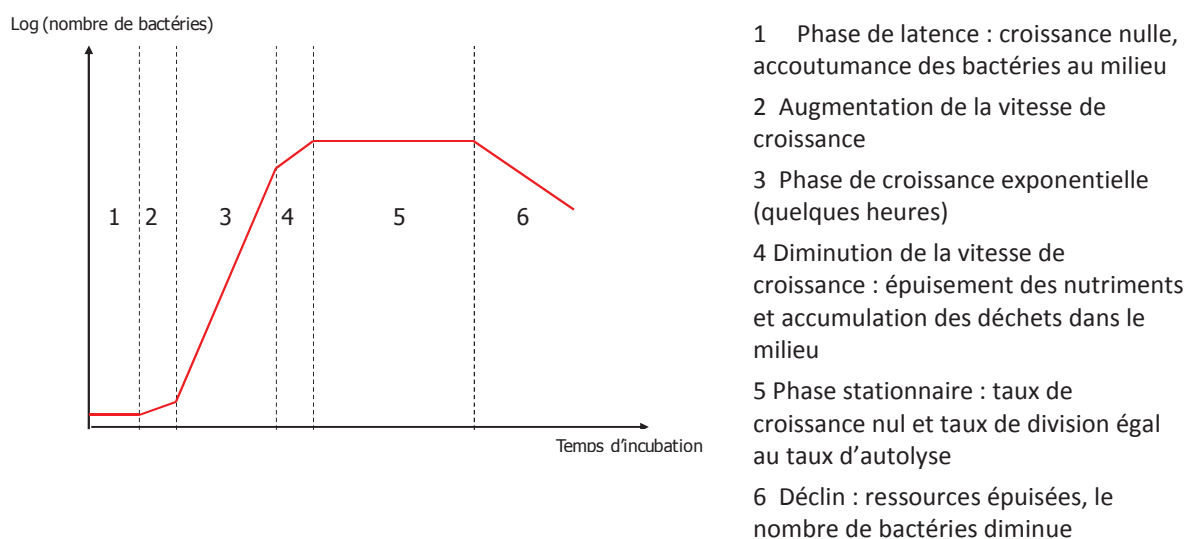


Figure 18 : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté et non renouvelé.

L'ajustement des différents inoculums à $6.8 \cdot 10^7$ bactéries/ μL est fait par photométrie (0.5 unité de MacFarland). Après une incubation de 18h à 37°C , les bactéries se trouvent en phase de croissance exponentielle. Un inoculum bactérien prélevé au cours de cette phase et ensemencé dans un milieu neuf croît sans aucune phase de latence.

Les tubes tests et les tubes témoins ont alors été constitués en ajoutant 1mL de cet inoculum en phase de croissance à :

- 9mL de dispersion de gel de chitosane préalablement préparée,
- 9mL de bouillon Brain-Heart, pour les tubes témoins.

Les tubes ont ensuite été placés à l'étuve à 37°C , et on a procédé à une numération bactérienne des tubes témoins, à T_0 , afin d'apprécier la concentration bactérienne initiale dans le milieu. On notera que la concentration en bactérie est initialement la même dans les tubes tests et les tubes témoins puisque chacun des tubes a reçu la même quantité d'inoculum pour le même volume de milieu de culture).

On procèdera à nouveau à une numération bactérienne après 3, 6, 24 puis 48 heures après T_0 , ceci pour les tubes tests et les tubes témoins. L'objectif est de comparer les concentrations bactériennes et les cinétiques de croissance entre les deux milieux.

Numération bactérienne

La numération se fait sur milieu gélosé. Les géloses TSA (Trypticase Soja Agar) contiennent du soja (5g.L^{-1}), du tryptone, du chlorure de sodium (5g.L^{-1}) et de la gélose (15g.L^{-1}). Le pH final est de 7.3 ± 0.2 à 25°C . Après préparation, les géloses sont stérilisées.

Pour la numération il est nécessaire de préparer une gamme de dilution, de 10 en 10 jusqu'à 10^{-12} . $10\mu\text{L}$ de chaque dilution des tubes témoins et des tubes tests ont été prélevés à l'aide d'une oëse calibrée puisensemencés en strie de 5cm sur les géloses TSA (*figures 19 et 20*). Les géloses ensemencées sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 24heures avant de procéder à la lecture des résultats.

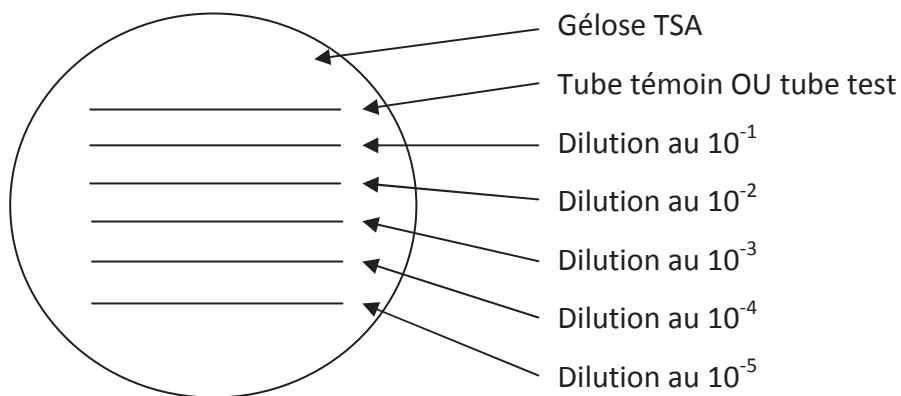


Figure 19 : Schéma d'ensemencement pour la numération bactérienne

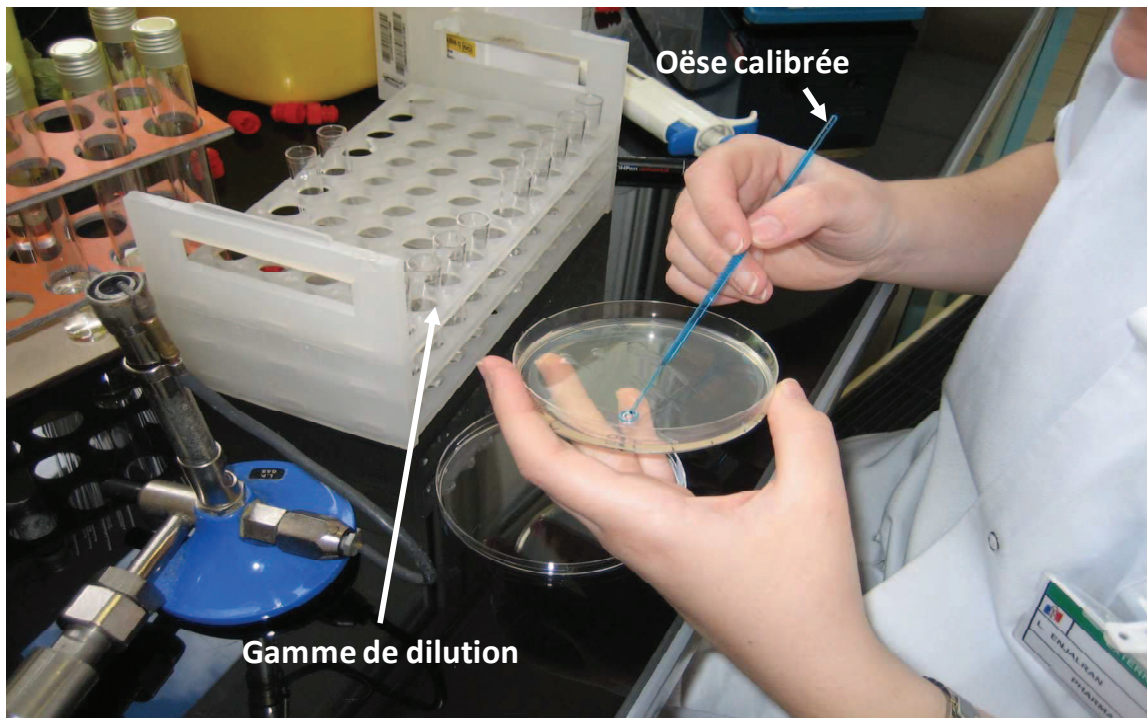


Figure 20 : ensemencement en stries

2^{ème} partie : étude à long terme de cicatrisation après brûlure profonde (E1)

Cette étude a été menée sur 6 porcs nains (race Göttingen) fournis par Ellegaard (Dalmoose, Danemark). Il s'agissait de femelles d'environ 20kg à leur arrivée. Au cours des deux premières semaines suivant leur arrivée, les truies furent mises en quarantaine et manipulées quotidiennement pour minimiser le stress occasionné au cours des soins ultérieurs.

Les animaux ont été hébergés dans des stabulations individuelles, en accord avec la législation prévue par le Ministère de l'Agriculture.

Le but de cette expérimentation était d'évaluer le processus de cicatrisation en présence d'hydrogels bi-couches et la qualité du tissu cicatriciel à long terme après brûlure profonde.

Avant la réalisation des brûlures, les porcs nains ont reçu une prémédication au Vetranquil® (0.1mL/kg) vingt minutes avant de recevoir une injection intramusculaire d'Imalgene-Rompun® (10mg/kg ketamine + 2mg/kg xylazine).

L'anesthésie a été maintenue par voie gazeuse (Isoflurane 2.5%, 100% O₂).

On a alors procédé au tatouage des animaux, afin de matérialiser les zones à brûler et de suivre de manière plus précise la rétraction des plaies au cours de la cicatrisation. (*figure 21*)

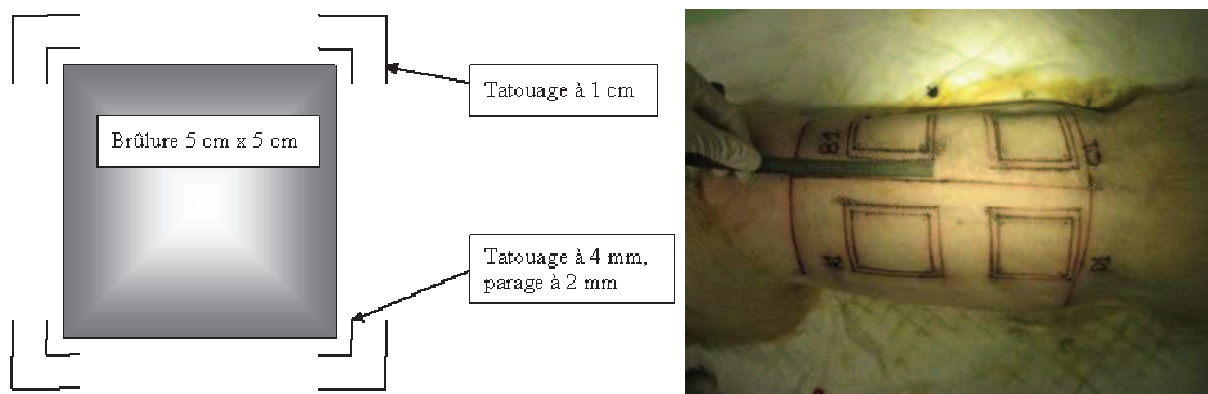


Figure 21 : Schéma du tatouage des animaux (gauche) et photographie du porc 1 après tatouage.

Sous anesthésie profonde, quatre brûlures (5cm x 5cm) ont alors été réalisées sur le dos de chaque animal : 2 brûlures en zone thoracique, 2 brûlures en zone lombaire. L'obtention

de brûlures du troisième degré a été assurée par l'application, à sec, d'un bloc de laiton de section 5x5cm chauffé à 100°C et comportant un dynamomètre intégré permettant d'appliquer une force de 80N pendant 30 secondes. (figure 22)



Figure 22 : Réalisation des brûlures à l'aide d'un dispositif composé d'un bloc de laiton chauffé à 100°C et d'un dynamomètre permettant l'application d'une force de 80N pendant 30 secondes.

Cette procédure permet l'obtention d'une brûlure profonde, affectant toutes les couches de la peau, mais préservant l'intégrité des muscles sous-jacents. L'analgésie a été garantie par une injection immédiate, après les brûlures, de 10mg de morphine (Morphine AguettantND) et par la mise en place d'un patch à diffusion progressive (50µg/h) de Fentanyl (DurogesicND), remplacé tous les trois jours pendant les vingt premiers jours.

Une étude histologique des zones brûlées a permis d'établir que le tissu était nécrosé en profondeur (figure 23). En effet dès les premières minutes suivant l'application du fer, toutes les couches de l'épiderme ainsi que le derme superficiel sont entièrement détruits, et on observe que le derme profond subit également les effets de la brûlure : les cellules du follicule pileux visible sur cette image sont partiellement détruites, laissant apparaître à l'image des espaces blancs.

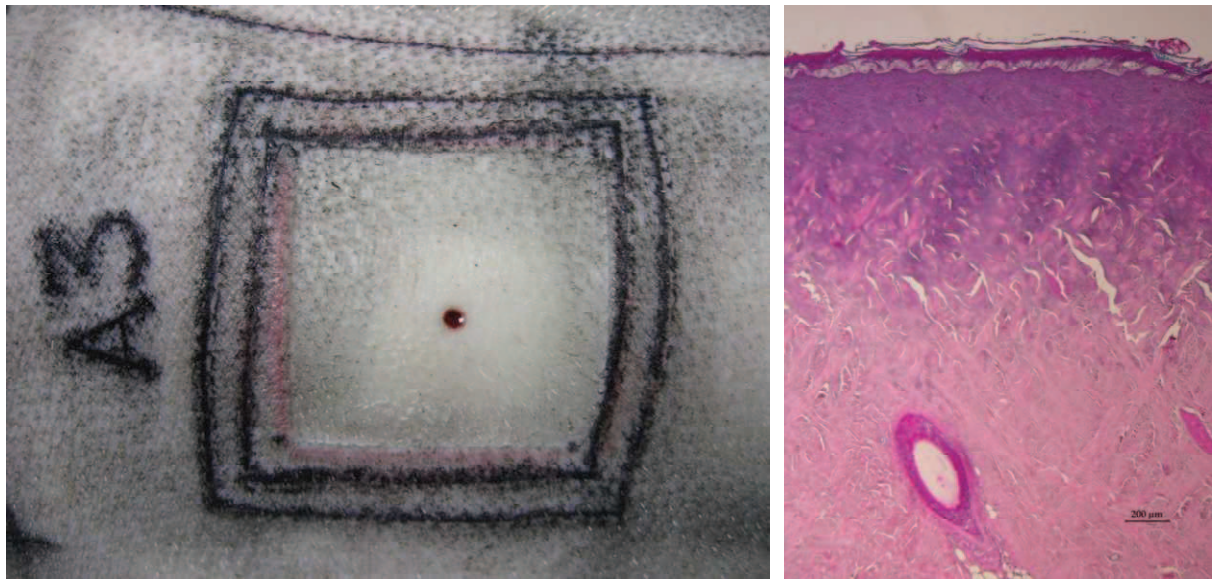


Figure 23 : Photographie de la peau du porc 3 juste après la brûlure (gauche) et histologie du tissu brûlé juste après l'application du fer (droite). Les différentes couches de l'épiderme au derme profond sont endommagées.

Deux jours après les brûlures, et sous anesthésie générale, on a procédé à la complète escarrectomie des tissus nécrosés (*Figure 24*). Deux types de soins ont été mis en place sur les plaies de manière aléatoire, pour assurer une évaluation en double aveugle de l'avancement de la cicatrisation. Deux plaies ont été couvertes par du Tulle Gras (témoins) et les deux plaies opposées (selon l'axe du rachis) ont été comblées par des hydrogels physiques de chitosane bicouches.

Ces deux types de dispositifs ont été maintenus à l'aide d'un film polyuréthane adhésif et respirant (Opsite). Enfin, des compresses stériles, une bande vello et une bande Elastoplaste ont été utilisées pour protéger l'ensemble du pansement.

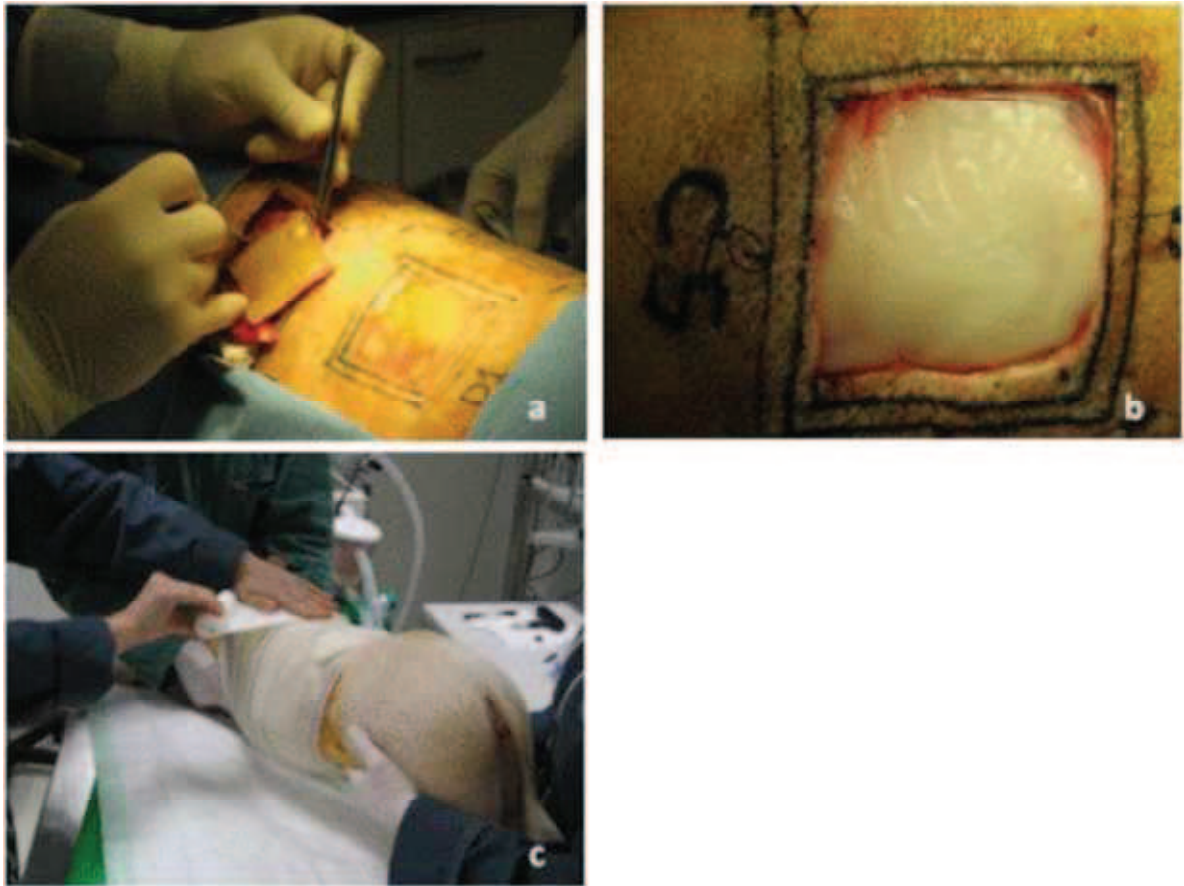


Figure 24: (a) Escarrectomie du tissu nécrosé, (b) implantation des hydrogels de chitosane, (c) réalisation des pansements secondaires à l'aide de bandes vello et de bandes Elastoplaste.

Dans le cas du Tulle Gras, les bandages ont été changés tous les deux jours et les tulles gras remplacés tous les deux jours tant que les plaies étaient suintantes, puis une fois par semaine. Dans le cas des implants hydrogels, seules les compresses et les bandes ont été changées. Après la complète épithélialisation (soit après 30 jours environ), les gels n'étaient plus en contact avec un milieu humide, ils se sont desséchés sans adhérer et sont tombés d'eux même. Nous avons alors laissé les cicatrices à l'air libre, dès lors que l'épiderme n'a plus semblé «fragile». Les gels desséchés ont alors été collectés pour des analyses ultérieures.

1 Suivi clinique

Outre le contrôle du poids et de l'état général des animaux, durant les 12 mois d'expérimentation un suivi longitudinal a été mis en place, consistant en un relevé

systématique de la morphologie des cicatrices grâce à des calques et des lors de chaque pansement, puis tous les 30 jours. Ces calques nous ont permis d'évaluer la contraction des cicatrices tout au long de l'étude.

D'autre part nous avons procédé à la mesure des pertes insensibles en eau (PEI), grâce à deux appareils : TeWaMeter et Vapometer (*figure 25*). En effet la mesure (non invasive) de cette grandeur traduit les propriétés barrières de la peau : toute augmentation de cette valeur correspond à une augmentation potentielle de la perméabilité cutanée.

Les appareils choisis utilisent le principe de la mesure du gradient de vapeur d'eau s'établissant dans une couche de 10 mm d'épaisseur au-dessus de la surface cutanée. Ces mesures nécessitent de se trouver dans des conditions environnementales particulières (température ambiante et humidité relative contrôlées), ce qui a conduit à une grande variabilité des mesures. Les résultats obtenus lors des mesures effectuées sur la peau saine et les cicatrices (quelque soit le soin appliqué) ne sont pas significativement différents et assez peu reproductibles, ils ne seront donc pas présentés dans ce mémoire.



Figure 25 : Mesure des pertes insensibles en eau à l'aide d'un TeWaMeter (a) et d'un Vapometer (b)

2 Etude histologique des tissus

2.2 Protocole de préparation des lames histologiques

La première étape de la préparation des échantillons avant une étude d'histologie est la fixation. Elle permet de préserver les structures dans un état semblable à celui observé dans

le tissu vivant. Cette étape a été réalisée à l'aide de formol à 10% tamponné. Le formol permet de conserver longtemps et sans détérioration les échantillons.

Ensuite il faut déshydrater les échantillons, et remplacer l'eau par de la paraffine. Pour cela on doit utiliser un agent intermédiaire : en effet l'eau et la paraffine n'étant pas miscibles, l'opération ne peut être réalisée en une seule étape. Le produit utilisé pour notre étude est un mélange d'alcool appelé OTTIX dont la composition n'est pas disponible. Une fois cette étape d'imprégnation terminée, on procède à l'inclusion proprement dite dans la paraffine.

Le bloc obtenu est ensuite prêt à être coupé au microtome. Les coupes sont ensuite étalées (déplissées) et collées sur une lame.

Afin que les colorants puissent pénétrer les échantillons, il faut en retirer la paraffine. C'est l'OTTIX, solvant de la paraffine préalablement utilisé, qui permettra d'éliminer la paraffine.

Les échantillons peuvent alors être réhydratés : en effet la plupart des colorants étant utilisés en solution aqueuse, le solvant alcoolique doit être complètement remplacé par de l'eau. Cette opération délicate doit se dérouler lentement car dans le cas contraire le prélèvement pourrait être endommagé par un éclatement cellulaire.

Après l'étape de coloration, on déshydrate à nouveau l'échantillon, grâce à un bain d'alcool à 95° puis de nouveaux bains d'OTTIX. Cette étape est réalisée de manière beaucoup plus rapide que les précédentes pour limiter une perte de la coloration.

Enfin on procède au montage des lames, qui consiste à fixer une lamelle sur la lame, à l'aide d'une résine miscible avec le solvant alcoolique.

Les coupes sont alors protégées mécaniquement et les colorants sont protégés du pouvoir oxydant de l'air ambiant. On peut alors les manipuler facilement et procéder à leur observation microscopique.

La technique de coloration choisie est une technique de routine pour l'étude des tissus conjonctifs : l'Hémalun-Eosine. On obtient des coupes histologiques avec des noyaux colorés en bleu, les cytoplasmes et les fibres colorées en rose, les érythrocytes colorés en rouge.

Pour l'observation de coupes immuno-histologiques, différents immuno-marqueurs spécifiques ont également été utilisés, en voici la liste :

Immuno-marqueurs	Spécificité
PAS	Lames basales
AE1-AE3	Cytokératines
Ki 67	Cellules en division (Indice de multiplication)
Bla36	Cellules dendritiques
CD3	Lymphocytes T
HM57	Macrophages
Protéine S100	Cellules de langherans, cellules dendritiques, cellules de Schwann
Facteur VIII	Cellules endothéliales
Collagène IV	Lames basales, vaisseaux

2.3 Choix des prélèvements à étudier

L'étude histologique des tissus a été réalisée en fin d'expérimentation, sur des prélèvements réalisés au biopunch, en zone saine, et au centre des cicatrices.

Une approche originale dans ce travail a été de s'intéresser non seulement aux tissus mais aussi aux matériaux ayant servi à la cicatrisation. Ainsi nous avons conservés les gels implantés après que ceux-ci se soient décollés des plaies et avons entrepris l'étude de leur composition.

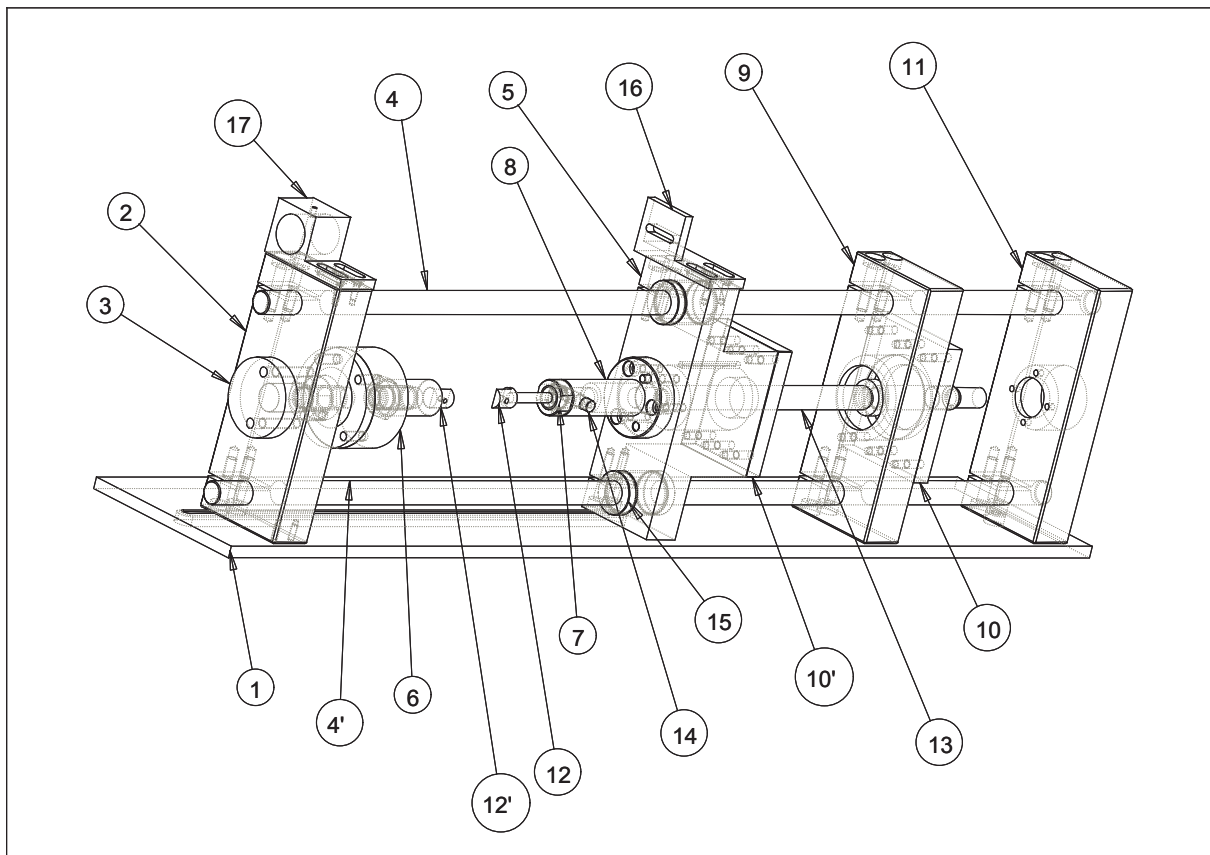
Cette caractérisation des matériaux est compliquée par les exsudats, le sang et les différentes protéines ayant été sorbés au cours des premières semaines de cicatrisation. Nous avons cherché dans un premier temps à évaluer une éventuelle dégradation des matériaux, se traduisant entre autre par une chute des masses molaires, et pour cela nous avons fait appel à la chromatographie d'exclusion stérique.

Ces matériaux ont été étudiés en histologie, selon le même protocole que les tissus prélevés.

3. Etude des propriétés mécaniques des tissus

3.1 Test de traction in vivo

Une machine de traction spécifique a été mise au point au sein du laboratoire pour procéder à l'étude des propriétés mécaniques du tissu cutané in vivo, de manière non invasive. Ces essais d'extensions cutanée ont été réalisés grâce au montage de la *figure 26*. Ce dispositif comprend une micromachine d'extension mécanique et un mécanisme de patins déportés sur un dispositif de distraction. En effet, pour éviter les efforts de flexion sur le capteur de force, un système de tringle / douille à billes est utilisé pour guider le déplacement des patins.



1	Plaque support	Dural
2	Traverse Fixe 4	Inox
3	Bride de force	Inox
4	Axes Ø 12	Acier
5	Traverse mobile	Inox
6	Capteur force	HBM 1kN U2B

7	Contre-écrou	Inox
8	Bride attache mors	Inox
9	Traverse fixe à palier	Inox
10	Capots pour traverses	Inox
11	Traverse support réducteur	Inox
12	Mors	Inox
13	Vis à galets satellites	INA série RGT Ø 12
14	Clavette Ø 6	Inox
15	Douille à bille Ø int 12	Bosch Rexroth R0600 012 00
16	Support noyau LVDT	Dural
17	Support capteur LVDT	Sensorex course 100mm

Figure 26a : micromachine d'extension mécanique

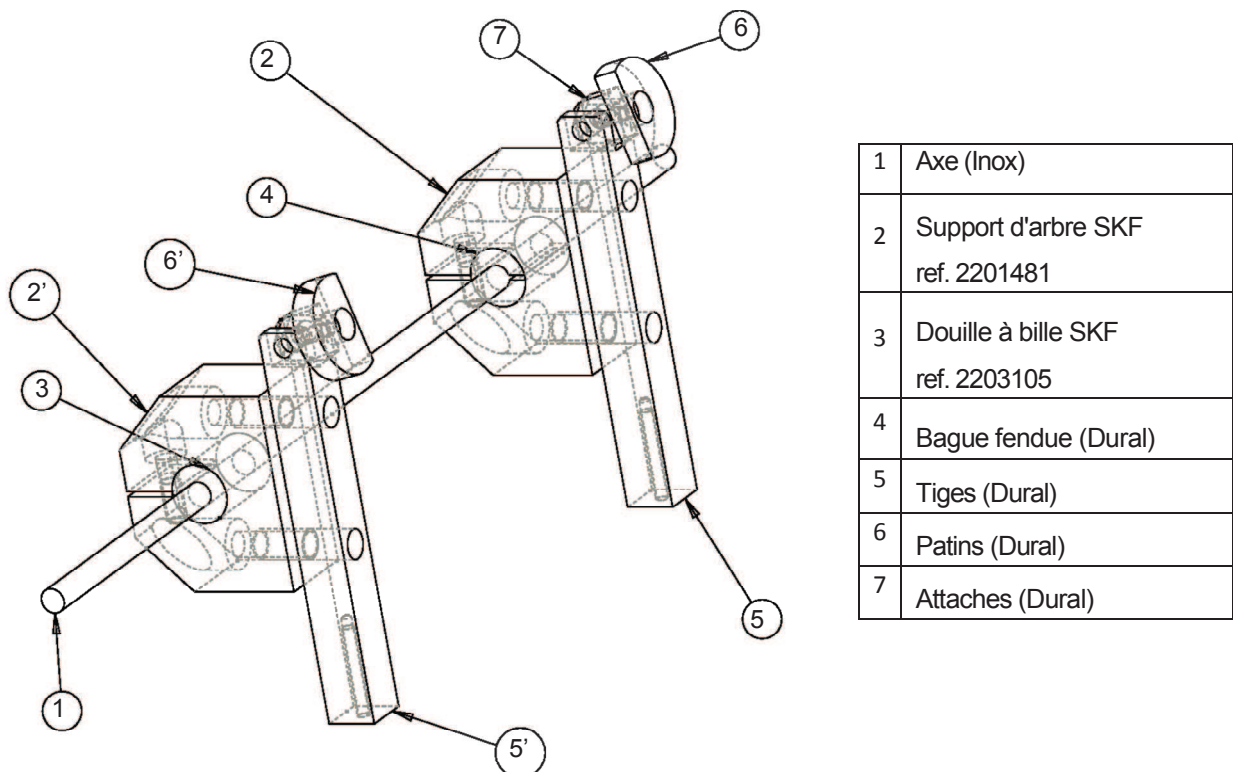


Figure 26b : mécanisme de patins déportés se fixant sur les mors de la micromachine

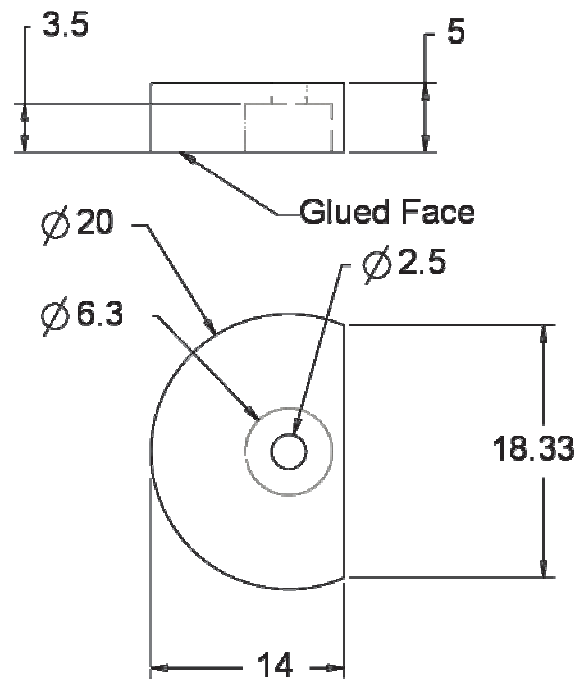


Figure 26c : Géométrie des patins métalliques, cotes en mm.

Les deux patins métalliques sont collés sur la peau de l'animal, grâce à une colle cyanoacrylate (Loctite Super Glu 3) à une distance de 10mm l'un de l'autre. Le dispositif est équipé d'une cellule de 100N et d'un capteur de déplacement LVDT de marque Sensorex avec une course maximale de 10cm.

Lors de chaque essai, on procède à deux cycles successifs de charge/décharge à une vitesse de 2mm/min, jusqu'à une contrainte maximale de 10N pour éviter une modification structurale trop importante de la peau.

Ces tests ont été réalisés après un an de cicatrisation, avant l'euthanasie des animaux, sur les sites cicatriciels et sur des zones saines situées à proximités des zones brûlées.

3.2 Test de traction ex vivo

Pour compléter l'étude mécanique des tissus, nous avons procédé, avant l'euthanasie des animaux, au prélèvement de tissu cutané sain et des tissus cicatriciels, après un an de cicatrisation (figure 14).

Les tests de traction ont été réalisés sur des bandes de peau, les dimensions de la zone utile soumise à l'étirement étant en moyenne de 10mm x 10mm, pour 3mm d'épaisseur

environ. Par la suite les résultats de contrainte moyenne apparente ont été calculés en prenant en compte la géométrie initiale (largeur, épaisseur) de chaque échantillon.

Au cours de chaque essai on a procédé à deux cycles de charge/décharge successifs à une vitesse de 2mm/min jusqu'à des contraintes maximales de 50N et 90N, respectivement.

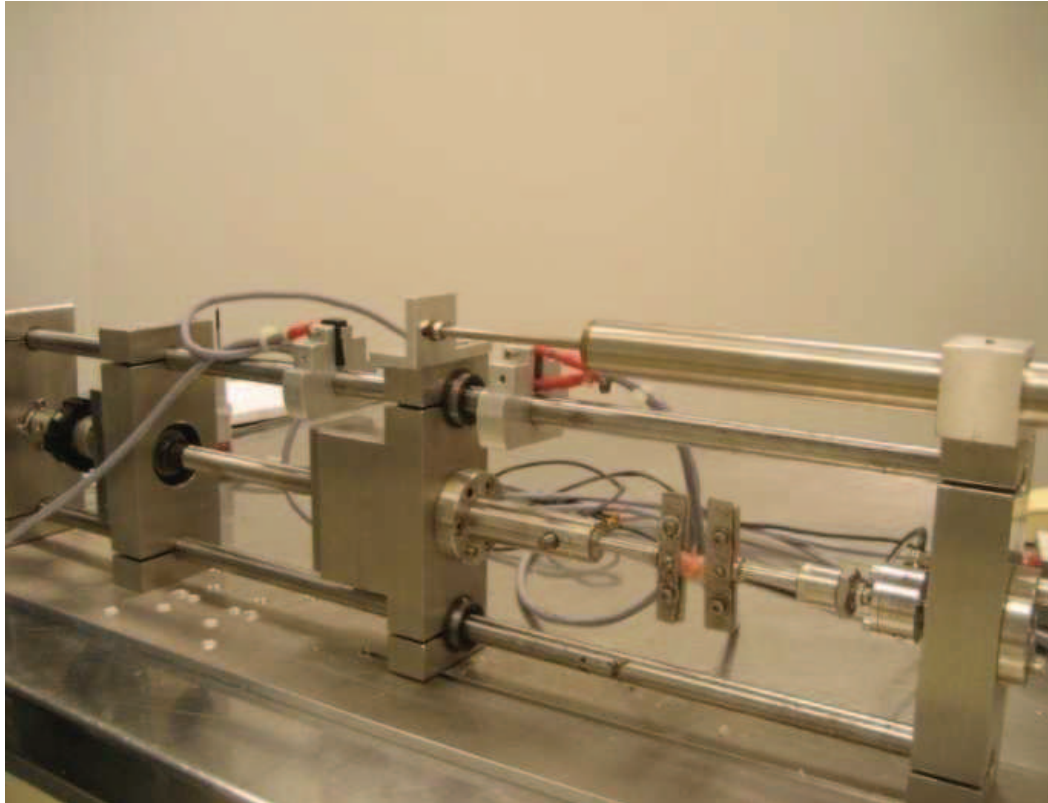


Figure 27 : Essai de traction ex-vivo pratiqué sur du tissu sain et du tissu cicatriciel un an après les brûlures.

3.3 Durométrie

Cliniquement, l'aspect des cicatrices (en particulier au toucher) nous est très vite apparu différent selon les sites, et il nous a fallu trouver une méthode moins subjective que la palpation pour évaluer la souplesse de la peau et quantifier les différences.

Dans la littérature, il apparaît que pour évaluer l'évolution de différentes pathologies cutanées (entre autre la sclérodermie systémique), l'outil le plus communément utilisé est la durométrie Shore. Ce type d'appareil est traditionnellement utilisé pour mesurer la dureté des élastomères.

Le principe de ce type de duromètre est simple : un poinçon s'enfonce dans l'échantillon sous une pression de ressort, dont la lecture est exprimée en unités Shore, comprises entre 0 et 100 (de « mou » à « dur »).

Il existe en réalité 12 échelles de dureté Shore différentes, il est donc essentiel de toujours spécifier le type d'appareil utilisé. Dans le cadre de l'étude de la peau, nous avons choisi un duromètre Shore O (Hildebrand HD-3000), qui correspond à l'étude des matériaux les plus souples.



Figure 28 : Duromètre Shore O (Hildebrand HD-3000)

3^{ème} partie : scénario de la cicatrisation en présence de chitosane (E3)

Suite aux résultats de l'étude E1, une seconde étude vétérinaire a été mise en place dans le but de mieux comprendre les mécanismes biologiques intervenant au cours de la cicatrisation en présence des gels. Cette nouvelle étude de cicatrisation a débuté le 29 septembre 2008 et s'est achevée le 3 novembre ; elle a été menée sur deux porcs charcutiers pesant 35kgs à leur arrivée.

A J 0, 10 plaies chirurgicales circulaires d'un diamètre de 3 cm ont été réalisées sur le dos de chaque animal. Avant la chirurgie, les porcs nains ont reçu une prémédication au Vetranquil[®] (0.1mL/kg) vingt minutes avant de recevoir une injection intramusculaire d'Imalgene-Rompun[®] (10mg/kg ketamine + 2mg/kg xylazine).

Les 10 plaies circulaires ont été comblées à l'aide d'hydrogels bicouches de chitosane, semblables à ceux utilisés lors de la première expérimentation.

L'anesthésie a été maintenue par voie gazeuse (Isoflurane 2.5%, 100% O₂).

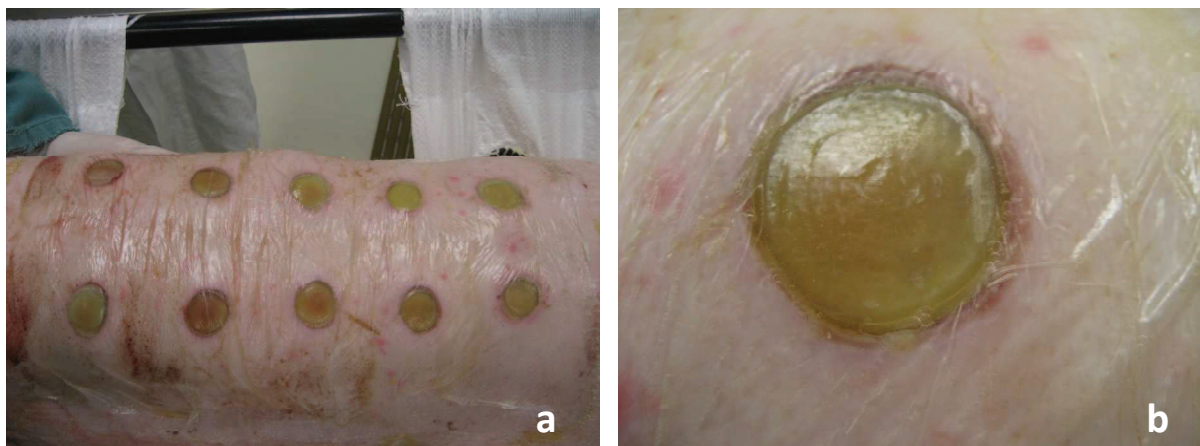


Figure 29: Avancement de la cicatrisation à J+4 : le gel 2 est sur le point d'être prélevé et remplacé, comme l'avait été le gel 1, 2 jours auparavant.

Ces gels ont ensuite été prélevés un à un à des temps différents (J2, J4, J7, J10, J14, J17, J21, J28 et J31) pour être étudiés par histologie (coloration Hémalun Eosine), selon le protocole décrit précédemment. A chaque changement de pansement, un seul gel a été prélevé et remplacé par un nouveau, les nouveaux gels ayant été laissés en place jusqu'à la fin de l'expérimentation (*figure 29*).

4^{ème} partie : étude de la nanostructure du tissu cutané

Afin de d'accéder à des caractéristiques structurales complémentaires nous permettant d'estimer la qualité de la cicatrisation de l'expérimentation E1, il était important d'étudier la peau à différentes échelles. En particulier nous avons souhaité compléter les résultats histologiques classiques par des observations en Microscopie Electronique en Transmission (TEM).

L'étude des images obtenues a été complétée à son tour par une approche physique des structures de la peau, grâce à une proposition d'expériences à l'ESRF soumise et acceptée pour

l'année 2007 (expérimentation réalisée en novembre 2007, à J211, en 4 jours de faisceau sur la ligne D2AM).

1. 1^{ère} approche : Microscopie Electronique en Transmission (TEM)

Une première série de prélèvements a été réalisée au mois de novembre 2007, après 211 jours de cicatrisation. Les analyses ont été réalisées au centre de microscopie de l'Université Claude Bernard.

A l'occasion de ces prélèvements, les tissus ont également été conservés et traités selon les protocoles d'étude histologique classique.

1.1 Protocole de fixation

Les prélèvements réalisés au biopunch ont été rincés dans un tampon Cacodylate de sodium 0,2M puis on a procédé à l'étape de fixation dans un mélange à volume égal d'une solution de glutaraldéhyde à 4% dans l'eau et de Cacodylate de sodium 0,2M.

Après une journée de fixation à 4°C, les échantillons ont été à nouveau rincés dans le tampon Cacodylate à 0,2M.

Une post-fixation est ensuite nécessaire : une heure dans un bain de tétroxyde d'Osmium à 1%.

1.2 Inclusion en résine

Les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes.

L'inclusion en résine (Epon) est précédée d'une étape de substitution et d'imprégnation sur plusieurs jours durant lesquels la résine est renouvelée. L'inclusion proprement dite est réalisée à l'étuve à 56°C pendant 3 jours.

Les blocs de résines obtenus peuvent alors être coupés au microtome. Les coupes, d'une épaisseur de 60nm, sont alors déposées sur des grilles et, après séchage, on procède à l'étape de contraste.

1.3 Contraste à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb

Le contraste des coupes se déroule en deux étapes, à l'aide deux produits de contrastes différents : l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

L'acétate d'uranyle est une substance toxique et faiblement radioactive à manipuler avec précaution. Les solutions d'acétate d'uranyle sont instables à la lumière, les manipulations s'effectueront donc en gardant au maximum la solution à l'abri de la lumière.

On utilise une solution d'acétate d'uranyle à 7% dans le méthanol, filtrée et gardée à l'obscurité. A l'aide d'un compte-gouttes on répartit un peu de solution dans des salières, immédiatement bouchées et mises à l'obscurité.

On dépose ensuite les grilles dans les salières, coupes vers le haut (les grilles ne flottent pas dans le méthanol). Le temps de contraste dans ces conditions est de 5 minutes, il est nécessaire de décaler l'immersion des grilles de quelques minutes pour avoir le temps de les rincer les unes après les autres.

Chaque grille est rincée dans 4 piluliers successifs, les 2 premiers contiennent du méthanol, le troisième un mélange volume à volume de méthanol et d'eau distillée filtrée, et le quatrième de l'eau distillée filtrée. Chacune des grilles est rapidement plongée 20fois consécutives dans le liquide de rinçage de chaque pilulier.

Les grilles sont ensuite placées sur un papier filtre, coupes vers le haut, pour séchage.

Préparation de la solution de citrate de plomb :

Mettre dans un ballon de 50 mL

- | | | |
|---|-------|---|
| - Nitrate de plomb, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ | 1.33g | |
| - Citrate de sodium, $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7), 5\text{H}_2\text{O}$ | 2.13g | (ou $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7), 2\text{H}_2\text{O}$ 1.76g) |
| - H_2O distillée | 30 mL | |

Boucher et agiter vigoureusement pendant 1 minute. Un précipité blanc se forme. Ajouter lentement 8 mL de NaOH, 1N. Le précipité se dissout peu à peu, compléter à 50mL avec de l'eau distillée, mélanger. La solution doit être limpide, son pH est voisin de 12.

A l'intérieur d'une boîte de Pétri contenant une couche de soude en pastille (pour absorber le dioxyde de carbone de l'air, responsable de la formation de précipités de PbCO_3), disposer une petite coupelle dont le fond aura été recouvert d'une petite couche de cire dentaire.

Déposer sur la couche de cire autant de gouttes de solution de citrate de plomb que de grilles à contraster, puis faire flotter les grilles, coupes vers le bas. Il est conseillé de soulever à peine le couvercle de la boîte de Pétri et d'éviter de respirer au dessus pour limiter la quantité de CO_2 .

Après 10 minutes de contraste, rincer les grilles en les plongeant plusieurs fois dans une solution de soude (0.02 N), puis dans trois bains successifs d'eau distillée filtrée. Les grilles sont ensuite placées, coupes vers le haut, sur un papier filtre pour séchage.

Les coupes sont prêtes à être observées en microscopie électronique en transmission. Les observations ont été réalisées au Centre Techniques des microstructures (UCBL) à l'aide d'un microscope électronique Philips CM120, sous une tension d'accélération de 80kV.

2. 2^{ème} approche : diffusion des rayons X aux petits angles

Afin d'étudier la structure de la peau des animaux, et en particulier l'orientation des fibres de collagène et la modification de celle-ci au cours des sollicitations mécaniques de la peau, nous avons utilisé la technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Les essais ont été menés sur la ligne D2AM, au synchrotron de Grenoble (*figure 30*).

L'objectif était d'étudier la peau des animaux de l'expérimentation E1, et notamment de comparer l'organisation des tissus sains avec celle des cicatrices obtenues après un an de cicatrisation.

En effet la littérature décrit les rayons X comme un outil de choix pour la caractérisation structurale de différents matériaux nanostructurés, et en particulier pour les matériaux d'origine biologique[10,11].

Le principe de la diffusion des rayons X aux petits angles repose sur l'étude de la diffusion élastique des rayons X par un échantillon présentant des hétérogénéités de densité électronique de l'ordre du nanomètre à quelques dizaines de nanomètres. La gamme d'angles utilisée correspond aux très petits angles (typiquement $0.01-4^\circ$).

On obtient dans cette gamme d'angles des informations variées sur la forme et la taille des hétérogénéités (particules), sur les distances caractéristiques interparticulaires et cela également dans le cas de matériaux orientés, sur la distribution de tailles des particules, sur l'estimation des rapports surface/volume particulaires, etc...

La source de rayons X peut être une source de laboratoire ou encore un rayonnement synchrotron lorsque les expériences nécessitent une résolution en angle importante, de faibles temps de pause ou encore une énergie du photon incident élevée ou un balayage d'énergie du photon incident (diffusion résonnante). La lumière synchrotron possède des caractéristiques exceptionnelles en comparaison des sources classiques disponibles en laboratoire, en particulier une grande brillance et un rayonnement stable, avec la possibilité de choisir une longueur d'onde incidente dans une large gamme.

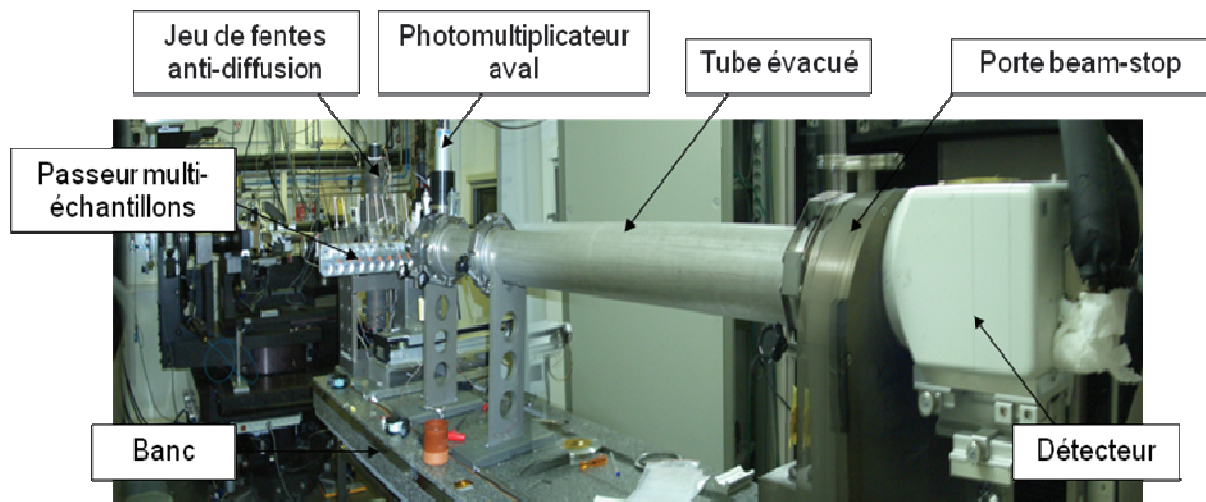


Figure 30 : La ligne D2AM, ESRF (Grenoble)

2.1 Etude de faisabilité

Afin d'optimiser l'expérimentation SAXS prévue sur les tissus prélevés au cours de l'expérimentation E1, nous avons mis en place une expérimentation préliminaire (E2).

L'objectif était de déterminer l'influence du temps et des conditions de conservation des prélèvements sur leur organisation structurale.

Le type d'échantillon à étudier est constitué de cellules cutanées piégées dans un réseau 3D complexe et fortement hydraté. Par conséquent plusieurs contraintes doivent être considérées : les échantillons doivent être fraîchement prélevés et l'expérimentation doit être de courte durée puisque la déshydratation pourrait altérer significativement la structure des tissus, et donc les conclusions de l'étude. Cela implique que les échantillons doivent être prélevés près de la ligne, c'est pourquoi l'animal a été hébergé au CRSSA (Centre de Recherche des Services de Santé de l'Armée), situé à proximité du campus technologique de l'ESRF.

L'animal choisi pour cette étude est un porc charcutier femelle d'environ 40kg.

Une série de biopsies réalisées au biopunch a été observée sous faisceau toutes les heures pendant 8 heures, et deux autres séries ont été observées sous faisceau puis placées respectivement à 4°C et à -18°C avant d'être ré-observées 8h après. L'observation a été réalisée sur des biopsies de peau derme+épiderme, le faisceau incident étant perpendiculaire au plan de l'épiderme. (Résultats présentés dans la dernière partie du manuscrit : « résultats expérimentaux »)

Cette expérimentation préliminaire qui nous a permis d'établir les conditions de conservations optimales pour les échantillons, nous a également permis d'établir un protocole d'étude de la peau de porc spécifique : 121 prélèvements ont été réalisés à l'aide de biopunchs sur le dos de ce porc. Les sites à prélever ont été préalablement repérés par tatouage (*figure 31*) et on a pris soin d'orienter les biopsies, de manière à toujours les placer de la même manière sur le porte-échantillons de la ligne, et pouvoir ainsi conclure sur l'orientation des fibres de collagène par rapport à l'axe du rachis de l'animal.

L'objectif était en effet d'étudier cette orientation selon la zone de prélèvement, afin de dresser une « cartographie » de ce réseau.

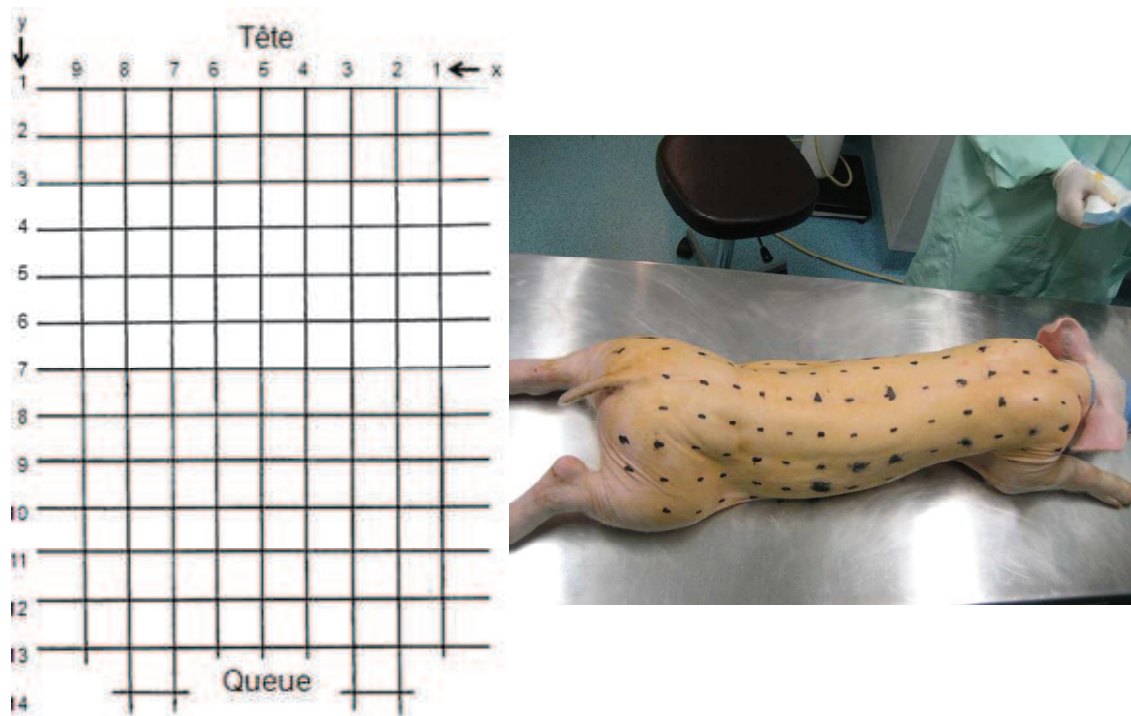


Figure 31 : Repérage préliminaire des 121 zones à prélever.

Les résultats ont fait l'objet d'un traitement informatique et d'une modélisation graphique, présentés là encore dans la partie « résultats expérimentaux ».

2.2 Caractérisation des tissus prélevés lors de l'expérimentation E1

Après cette étude préliminaire, la peau des animaux concernés par le protocole de cicatrisation (E1) a pu être étudiée à son tour. Les prélèvements ont été réalisés en Novembre 2007, après 211 jours de cicatrisation. Là encore, il fallait limiter le temps de conservation des échantillons, et nous avons donc procédé au transfert des animaux depuis l'Ecole Vétérinaire jusqu'au CRSSA. Le transfert a eu lieu 15 jours avant la date de la chirurgie, afin de minimiser l'impact du stress.

L'objectif de ces mesures de diffusion X a été de caractériser et comparer des échantillons de peau native et les tissus reconstruits dans diverses conditions (en présence de tulle gras, ou de nos hydrogels physiques bicouches). D'autre part nous avons cherché à décrire l'évolution de la morphologie des tissus au cours d'une traction in situ sous faisceau synchrotron, ce qui donne, à l'échelle microscopique, un sens aux lois de comportement mécanique que nous avons identifiées grâce aux essais de traction in et ex-vivo décrits

précédemment (densité et orientation des réseaux de collagène en fonction de la déformation appliquée).

Une telle approche microstructurale des propriétés mécaniques des tissus reconstruits est originale pour mieux appréhender la qualité de la cicatrisation et le rôle de nos hydrogels dans la régénération de la peau.

Sous anesthésie, les deux cicatrices antérieures de chaque animal ont été prélevées, dégraissées et « scannées » sous faisceau synchrotron. De nombreuses images de diffusion ont ainsi été obtenues, permettant d'évaluer les différences structurales existant au sein des cicatrices elles-mêmes.

Les prélèvements ont ensuite été recoupés sous forme de bandes rectangulaires (10x25mm) et soumis à un essai de traction sous faisceau. Les résultats ont été normalisés selon la morphologie exacte des échantillons de peau testés.

Les sites antérieurs prélevés ont été suturés et le suivi de la cicatrisation des plaies postérieures a été poursuivi jusqu'à J373.

La suite de ce mémoire sera consacrée à l'ensemble des résultats obtenus suite aux expérimentations qui viennent d'être décrites.

Certains de ces résultats sont rassemblés et énoncés sous forme de publications qui seront soumises prochainement, tandis qu'une autre partie des résultats obtenus est rédigée sous forme manuscrite. Même si ils n'ont pas pu être valorisés sous forme de publications, ces résultats contribuent à la compréhension de notre démarche et soulèvent le plus souvent de nouvelles questions donnant lieu à de nouvelles perspectives de recherche, c'est pourquoi nous les avons maintenus dans ce mémoire.

Références bibliographiques

(chapitre 2)

- [1] N. Boucard, C. Viton, and A. Domard, New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 3227-3237.
- [2] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomaterials*, 26 (2005) 933-943.
- [3] A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. T. Corvol, and A. Domard, A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering, *Biochimie*, 88 (2006) 551-564.
- [4] S. Popa-Nita, P. Alcouffe, C. Rochas, L. David, and A. Domard, Continuum of Structural Organization from Chitosan Solutions to Derived Physical Forms, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 6-12.
- [5] L. Y. Lim, E. Khor, and C. E. Ling, Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research*, 48 (1999) 111-116.
- [6] L. Y. Lim, E. Khor, and O. Kool, gamma irradiation of chitosan, *Journal of Biomedical Materials Research*, 43 (1998) 282-290.
- [7] Y. M. Yang, Y. H. Zhao, X. H. Liu, F. Ding, and X. S. Gu, The effect of different sterilization procedures on chitosan dried powder, *Journal of Applied Polymer Science*, 104 (2007) 1968-1972.
- [8] P. R. Marreco, P. da Luz Moreira, S. C. Genari, and A. M. Moraes, Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 71B (2004) 268-277.
- [9] N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard, The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns, *Biomaterials*, 28 (2007) 3478-3488.
- [10] S. E. Bohndiek, E. J. Cook, C. D. Arvanitis, A. Olivo, G. J. Royle, A. T. Clark, M. L. Prydderch, R. Turchetta, and R. D. Speller, A CMOS active pixel sensor system for laboratory-based x-ray diffraction studies of biological tissue, *Physics in Medicine and Biology*, 53 (2008) 655-672.
- [11] A. Tartari, M. De Felici, M. Gambaccini, P. Querzoli, C. Bonifazzi, C. Ferrero, and R. Felici, Biological tissue characterisation in narrow beam x-ray scattering techniques, *X-Ray Spectrometry*, 38 (2009) 195-199.

Chapitre 3 : résultats expérimentaux

1^{ère} partie : propriétés antibactériennes des hydrogels physiques de chitosane

Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre de ce mémoire, les propriétés antibactériennes et antifongiques du chitosane en solution ou sous forme solide ont été largement décrites dans la littérature. Toutefois il nous est apparu nécessaire d'évaluer ces propriétés pour nos dispositifs se présentant sous forme d'hydrogels physiques car la prévention de l'infection est en effet essentielle à la cicatrisation cutanée.

Afin d'écarter tout effet du pH sur la croissance bactérienne, nous avons choisi de travailler à partir de dispersion de broyats d'hydrogels (dont la taille est de l'ordre de quelques dizaines de microns) dans le milieu de culture, comme expliqué dans le chapitre précédent.

Nous allons maintenant nous intéresser à la lecture des résultats ainsi qu'à leur interprétation, afin d'estimer le pouvoir antibactérien de nos dispositifs d'un point de vu qualitatif et quantitatif.

1. Lecture des résultats

La reproduction des bactéries a lieu par division cellulaire (ou scissiparité). Une bactérie mère va donc engendrer deux bactéries filles identiques qui pourront à leur tour se diviser. L'ensemble des bactéries issues d'une même cellule mère forme ce qu'on appelle une « colonie bactérienne ». Le nombre de colonies observées reflète donc la concentration bactérienne du milieu de culture au moment de l'ensemencement. Toutefois une colonie peut résulter également d'un agglomérat de bactéries déposées par hasard à proximité, ainsi on n'exprime pas les résultats d'une numération bactérienne en nombre de cellules, mais en « unités formant des colonies » ($\text{UFC} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ou $\text{CFU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, pour « Colony Forming Unit »). Chaque colonie provient en effet d'une UFC qui peut être soit une bactérie, soit un amas de bactéries si serrées qu'elles forment une seule colonie.

Sur les géloses ensemencées et incubées, le comptage des colonies est effectué sur la strie correspondant à la plus grande dilution (c'est-à-dire la concentration en bactéries la plus faible) qui ait donné lieu à la formation de colonies. Quand cela est possible, le comptage est également réalisé sur l'avant dernière strie, afin de vérifier la concordance des résultats. Après correction du facteur de dilution, on obtient la concentration bactérienne du milieu au moment de l'ensemencement (*figure 32*).

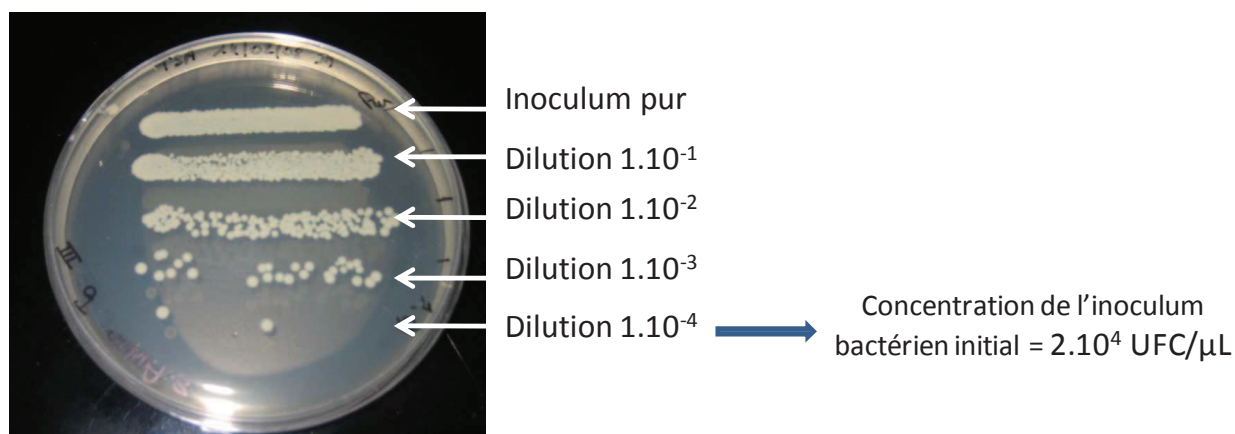


Figure 32 : lecture des résultats. Le comptage est réalisé sur la strie correspondant à la dilution au $1/10000^{\text{ème}}$ où on peut observer deux colonies. Une fois le facteur de dilution pris en compte, on en déduit donc une concentration initiale dans l'inoculum de $2 \cdot 10^4$ UFC/ μL . (La strie précédente ne permet pas un comptage précis, toutefois on peut estimer qu'elle présente 28 colonies, ce qui correspond à une concentration de $2,8 \cdot 10^4$ UFC/ μL (ce qui est conforme à la valeur lue grâce à la dernière strie.)

2. Cinétique de croissance bactérienne

Lors de cultures bactériennes, on peut observer plusieurs types d'évolution de la concentration en bactérie, par rapport aux tubes témoins (*figure 33*) :

- La concentration bactérienne augmente, mais moins vite que dans les tubes contenant uniquement le milieu de culture : on parle de bactériostase, qui se définit comme une atteinte de la croissance bactérienne telle que le nombre de bactéries formées par division cellulaire dans le tube test est inférieur à celui formé dans le tube contenant uniquement le milieu de

culture. L'effet bactériostatique observé résulte soit d'une diminution du nombre de divisions des bactéries, sans altération de leur vitalité ; soit d'un équilibre entre le nombre de division et la mort bactérienne.

- La concentration bactérienne est constante : la bactériostase est maximale, le nombre de bactéries reste égal à celui de l'inoculum.

- La concentration bactérienne diminue : on parlera alors de bactéricidie.

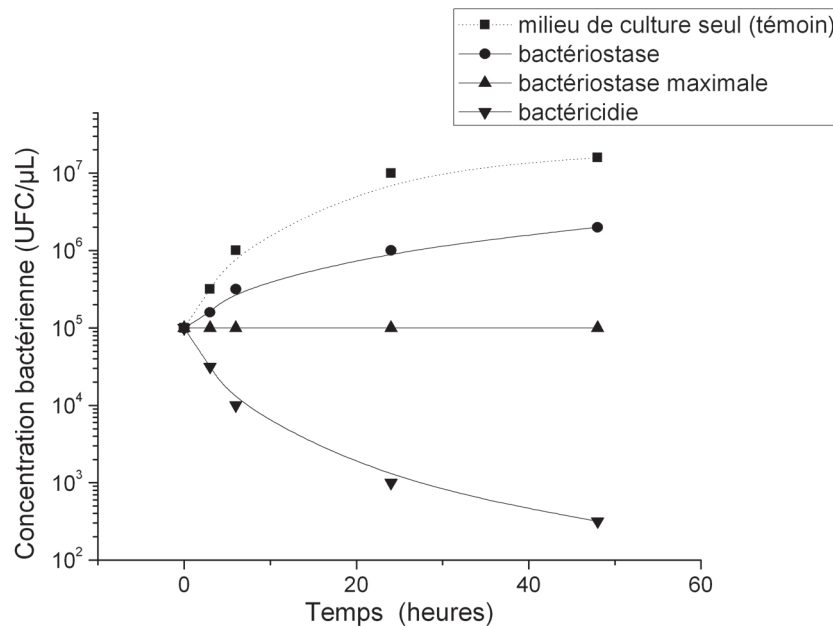


Figure 33 : Schéma des différentes évolutions de la concentration bactérienne au cours du temps selon les propriétés antibactériennes du milieu. A des temps plus longs, la concentration bactérienne se stabilise puis diminue, du fait de la consommation totale des éléments nutritifs du milieu.

On notera que toutes les techniques d'étude de l'activité des antibiotiques sont basées sur deux mesures :

- La CMI (concentration minimale inhibitrice): plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 24 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

- La CMB : plus petite concentration d'antibiotique laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 24 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

Il découle de ces mesures une classification des antibiotiques en 2 groupes:

les antibiotiques bactéricides, les CMB sont proches des CMI,
et les antibiotiques bactériostatiques, les CMB sont éloignées des CMI.

Selon ces critères, on pourra considérer que dans les conditions de notre étude (concentration en chitosane égale à 1% en masse dans le milieu) on aura atteint un effet bactéricide si le nombre bactéries a diminué d'au moins deux logs décimaux après 24h de culture. Sinon nous parlerons, dans ces conditions, d'effet bactériostatique.

Pour chaque bactérie, l'évolution du dénombrement au cours du temps (t_0 , t_{0+3} , t_{0+6} , t_{0+24} , t_{0+48}) a été étudiée dans le milieu témoin et dans le milieu additionné de broyats d'hydrogels de chitosane. L'analyse statistique des données a été effectuée selon un test ANOVA appliqué au cas des séries non appariées en prenant en compte les résultats obtenus au cours des 5 expérimentations successives ($n=5$). Ce test est une analyse de variance indiqué pour la comparaison d'échantillons indépendants. Les résultats de cette analyse statistique nous permettent d'estimer si la croissance bactérienne est significative¹.

Ensuite, pour chaque souche bactérienne, les 5 dénombrements effectués après culture dans les tubes tests ont été comparés aux 5 dénombrements réalisés après culture en présence de chitosane, à chaque temps de culture. Cette comparaison a été effectuée à l'aide d'un test Mann et Whitney², indiqué pour la comparaison de données quantitatives entre deux échantillons indépendants (c'est-à-dire des données non appariées).

¹ Pour un tube donné (témoin ou tube avec hydrogel) la série X0 rassemble les ($n=5$) dénombrements au temps initial, X3 à 3h, etc..et X48 les données à 48h. L'analyse ANOVA suppose une distribution de toutes les données selon une loi normale avec la même variance. Elle fournit la probabilité p que toutes les dénombrement à un temps donné proviennent de la même population. Sous Matlab avec la toolbox 'Statistics', on obtient p avec

```
X0=[5.2 5.15 5.9 4 5]; % entree des donnees
```

```
...
```

```
X48=[7.3 6.8 7.2 7.2 7.2];
```

```
p=anova1([X0;X3;X6;X24;X48]'),
```

ou encore `p=anova1([X0;X48]')` si l'on veut juste tester la significativité des différences des les séries de données à temps initial et à 48h.

² Pour chaque expérimentation, et pour un temps de culture donné (0,3;6; 24 ou 48h), X rassemble les n dénombrements pour le tube témoin et Y rassemble les dénombrements pour le tube avec hydrogels pour le même temps. On calcule ensuite U, c'est à dire le nombre d'observations pour lesquelles $X_i > Y_j$ (en comptant 0.5

Généralement, pour l'analyse statistique des résultats, les différences observées sont jugées significatives avec un risque α de 5%, ce qui correspond à $p < 0,05$. Pour des valeurs de $p < 0,05$, les données sont donc significativement différentes.

2.1 Résultats obtenus pour *Escherichia coli*

Les cinétiques de croissance d'*Escherichia coli* dans le bouillon de culture Brain Heart (tube témoin) et dans le bouillon enrichi de broyats d'hydrogel de chitosane sont présentées dans la *figure 34*.

Les résultats de l'étude statistique sont présentés dans la *figure 35*. Avec une valeur de $p < 0.05$ on peut conclure à une augmentation significative de la concentration bactérienne dans les deux types de tubes, au cours des 48h de culture. Dans ce milieu et dans ces conditions de concentration (1% en masse de chitosane dans le milieu de culture), le chitosane n'empêche donc pas la croissance d'*Escherichia coli*. Toutefois l'étude statistique du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane montre que dès la 3^{ème} heure le nombre de bactéries présentes dans le milieu est significativement plus faible dans les tubes contenant la dispersion d'hydrogel de chitosane que dans les tubes contenant uniquement le bouillon de culture.

Ceci nous amène à conclure que dans le cas présent l'hydrogel de chitosane joue un rôle bactériostatique, mais que cette bactériostase n'est pas maximale puisque la croissance bactérienne se poursuit dans les tubes tests.

pour les cas où $X_i = Y_j$). La probabilité p est tabulée en fonction de U , du nombre d'observations dans X et du nombre d'observations dans Y .

Avec Matlab, $[p, h] = \text{ranksum}(X, Y)$, sous octave: $[p, z] = \text{u_test}(X, Y)$

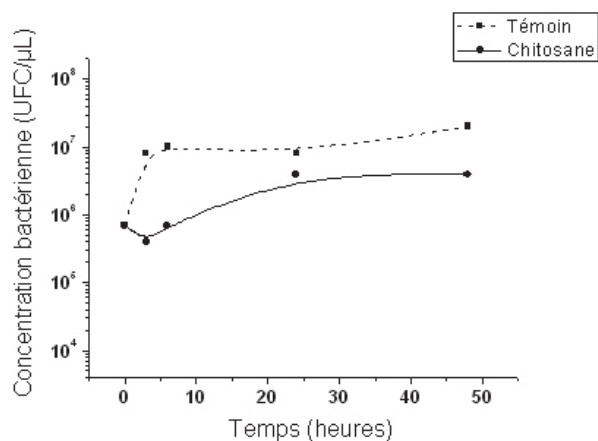
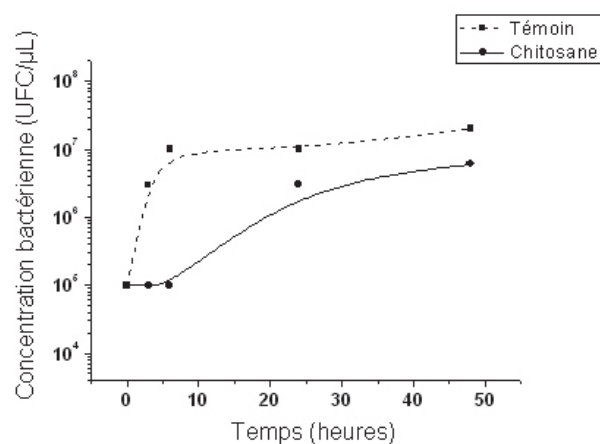
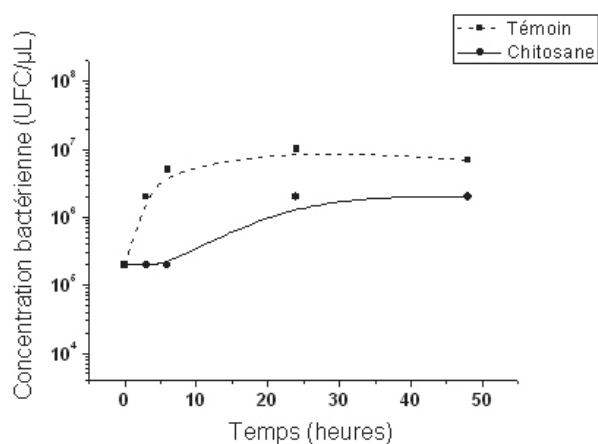
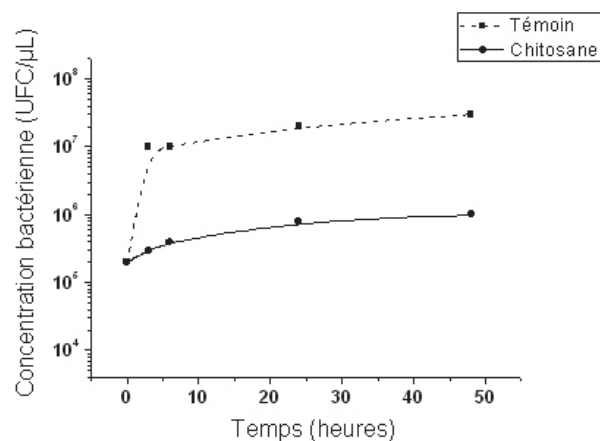
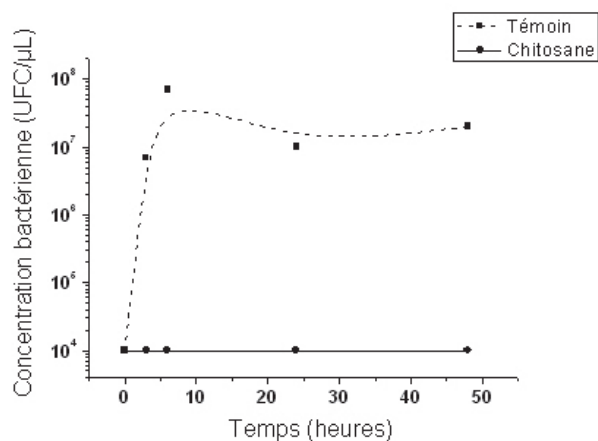


Figure 34 : cinétique de croissance bactérienne d'*Escherichia coli*, l'essai a été répété 5 fois. (les courbes sont tracées pour faciliter la lecture des résultats)

Évolution du nombre de bactéries au cours des 48h		Comparaison du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane				
Tube témoin	Dispersion d'hydrogel	T0	T0+3h	T0+6h	T0+24h	T0+48h
0.003	0.006	NS	0.008	0.008	0.008	0.008

Figure 35 : Résultats de l'analyse statistique. Test ANOVA et test Mann et Whitney (données non appariées). Valeurs de p obtenues pour 5 essais pris en compte. NS=non significatif

2.2 Résultats obtenus pour *Pseudomonas aeruginosa*

Les cinétiques de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans le bouillon de culture Brain Heart (tube témoin) et dans le bouillon enrichi de broyats d'hydrogel de chitosane sont présentées dans la figure 36.

Les résultats de l'étude statistique sont présentés dans la figure 37. Le nombre de bactéries croît de manière significative au cours des 48h dans le tube témoin comme l'indique la valeur de p (0.002). En revanche le nombre de bactéries n'évolue pas de manière significative dans les tubes tests au cours des 48h de culture. On en conclut que, dans ce milieu et dans ces conditions de concentration, le chitosane ralentit la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. L'étude statistique du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane montre qu'à t_{0+6h} et à t_{0+24h} le nombre de bactéries présentes dans le milieu est significativement plus faible dans les tubes contenant la dispersion d'hydrogel de chitosane que dans les tubes contenant uniquement le bouillon de culture. Le profil des courbes de cinétique de croissance ainsi que l'étude statistique de l'évolution de la concentration bactérienne au cours des 48h de culture suggèrent un effet bactériostatique maximal du chitosane vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* dans les conditions de l'expérience.

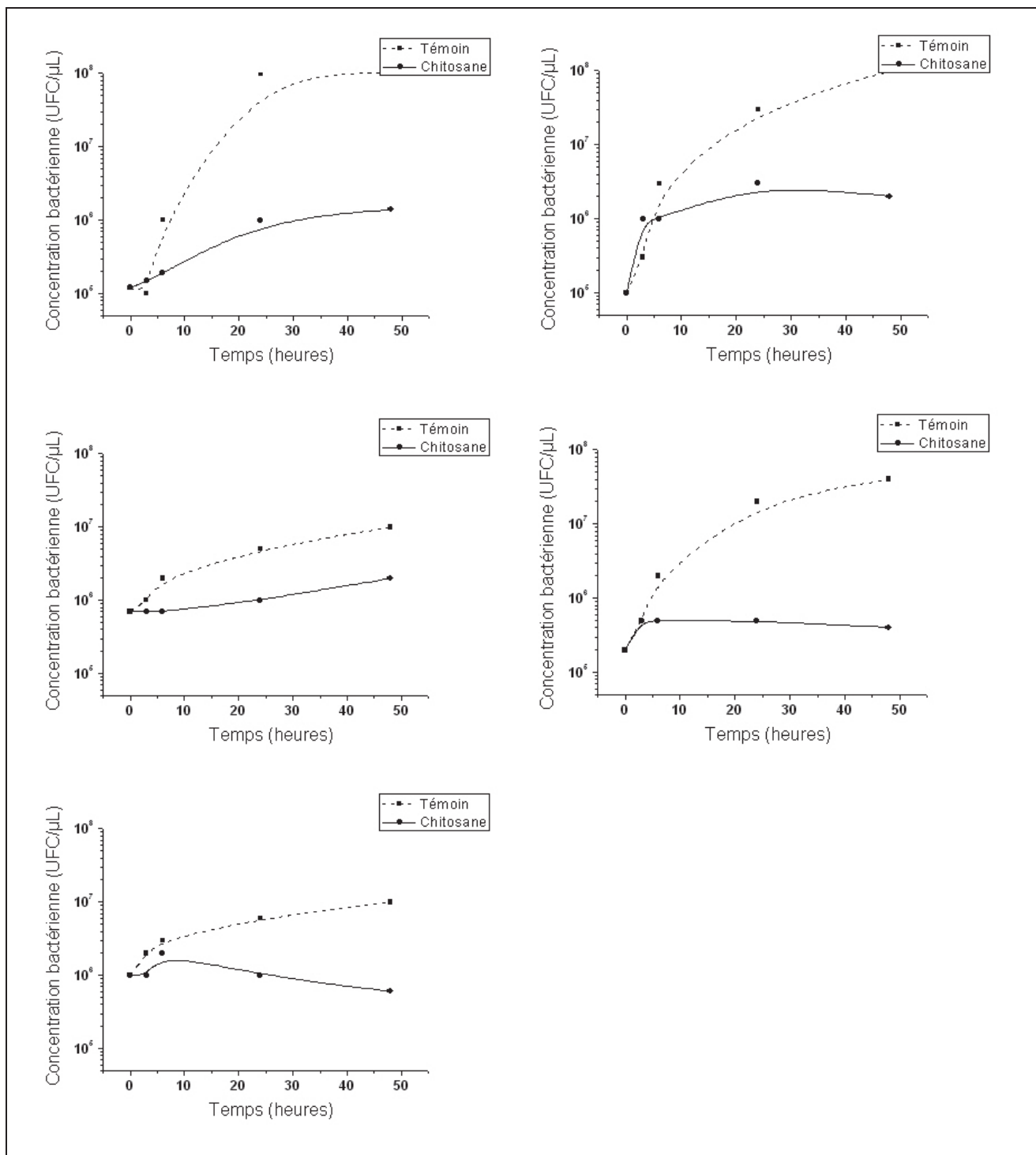


Figure 36 : cinétique de croissance bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa*, l'essai a été répété 5 fois. (les courbes sont tracées pour faciliter la lecture des résultats)

Évolution du nombre de bactéries au cours des 48h		Comparaison du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane				
Tube témoin	Dispersion d'hydrogel	T0	T0+3h	T0+6h	T0+24h	T0+48h
0.002	NS	NS	NS	0.032	0.032	NS

Figure 37 : Résultats de l'analyse statistique. Test ANOVA et test Mann et Whitney (données non appariées). Valeurs de p obtenues pour 5 essais pris en compte.

2.3 Résultats obtenus pour *Staphylococcus aureus*

Les cinétiques de croissance de *Staphylococcus aureus* dans le bouillon de culture Brain Heart (tube témoin) et dans le bouillon enrichi de broyats d'hydrogel de chitosane sont présentées dans la *figure 38*.

Les résultats de l'analyse statistique sont présentés dans la *figure 39*. Le nombre de bactéries croît de manière significative au cours des 48h dans le tube témoin comme l'indique la valeur de p (0.004). En revanche le nombre de bactéries n'évolue pas de manière significative dans les tubes tests au cours des 48h de culture. On en conclut que, dans ce milieu et dans ces conditions de concentration, le chitosane ralentit la croissance de *Staphylococcus aureus*. L'étude statistique du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane montre qu'à t_{0+48h} le nombre de bactéries présentes dans le milieu est significativement plus faible dans les tubes contenant la dispersion d'hydrogel de chitosane que dans les tubes contenant uniquement le bouillon de culture. Mais cette observation n'est pas valable pour les temps de culture plus courts. Toutefois le profil des courbes de cinétique de croissance suggère une fois de plus un effet bactériostatique du chitosane, qu'on peut qualifier de maximal, puisque la croissance bactérienne n'est pas significative au cours des 48h de culture d'après les résultats de l'analyse statistique.

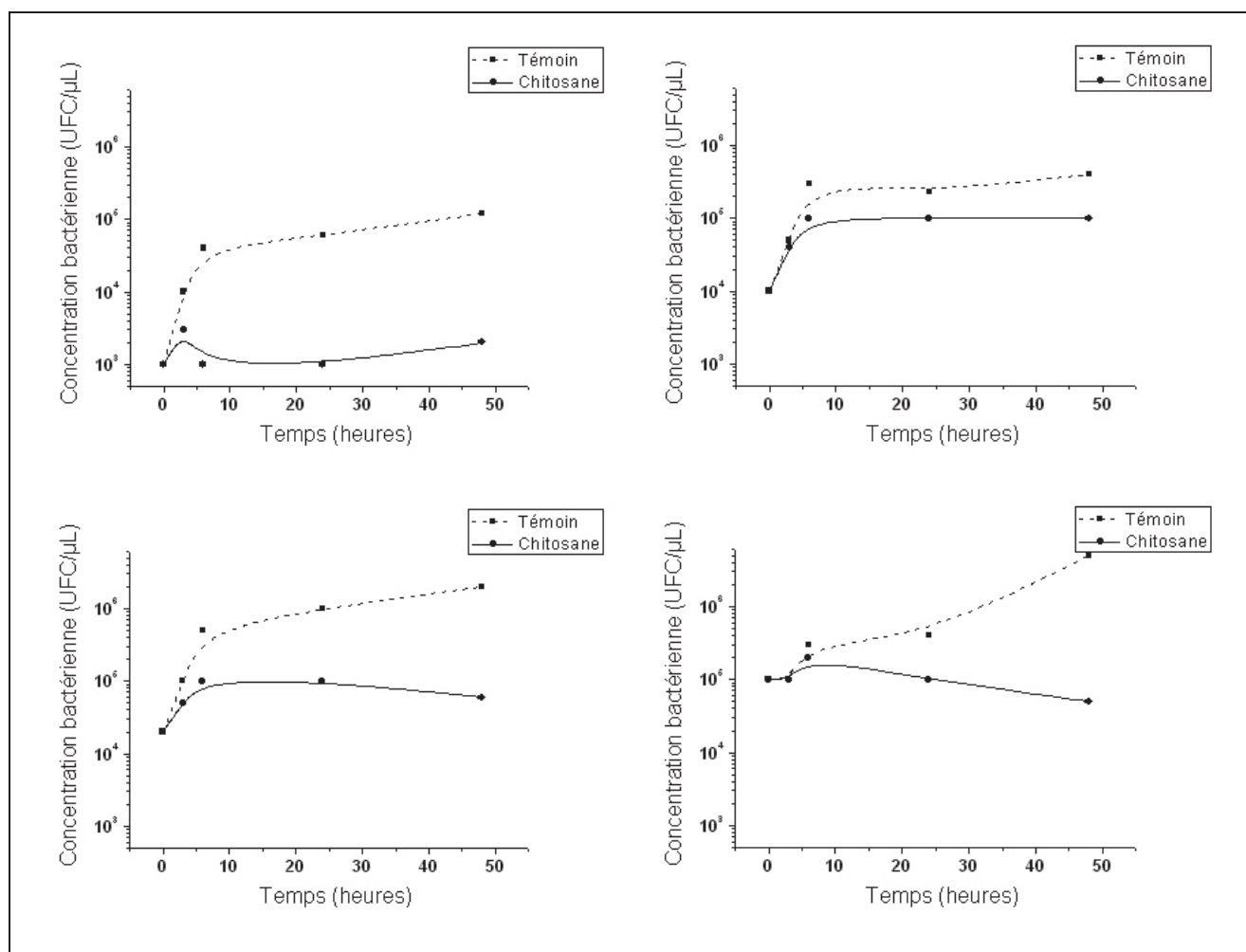


Figure 38 : cinétique de croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus*, 4 essais ont été pris en compte. (les courbes sont tracées pour faciliter la lecture des résultats)

Évolution du nombre de bactéries au cours des 48h		Comparaison du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane				
Tube témoin	Dispersion d'hydrogel	T0	T0+3h	T0+6h	T0+24h	T0+48h
0.004	NS	NS	NS	NS	NS	0.029

Figure 39 : Résultats de l'analyse statistique. Test ANOVA et test Mann et Whitney (données non appariées). Valeurs de p obtenues pour 4 essais pris en compte.

2.3 Résultats obtenus pour *Enterococcus faecalis*

Les cinétiques de croissance de *Enterococcus faecalis* dans le bouillon de culture Brain Heart (tube témoin) et dans le bouillon enrichi de broyats d'hydrogel de chitosane sont présentées dans la *figure 40*.

Les résultats de l'étude statistique sont présentés dans la *figure 41*. Le nombre de bactéries croît de manière significative au cours des 48h dans le tube témoin comme l'indique la valeur de p (<0.001). En revanche le nombre de bactéries n'évolue pas de manière significative dans les tubes tests au cours des 48h de culture. On en conclut que, dans ce milieu et dans ces conditions de concentration, le chitosane ralentit la croissance de *Enterococcus faecalis*. L'observation des courbes de cinétique de croissance bactérienne montre même une diminution de la concentration bactérienne en présence de chitosane, c'est-à-dire une action bactéricide. L'étude statistique du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane montre qu'à partir de la 6^{ème} heure le nombre de bactéries présentes dans le milieu est significativement plus faible dans les tubes contenant la dispersion d'hydrogel de chitosane que dans les tubes contenant uniquement le bouillon de culture. Le chitosane semble donc bactéricide vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*, toutefois on notera que selon les critères définis précédemment (diminution de la concentration bactérienne de deux logarithmes décimaux), le pouvoir bactéricide reste discutable, du moins dans les conditions de l'expérience.

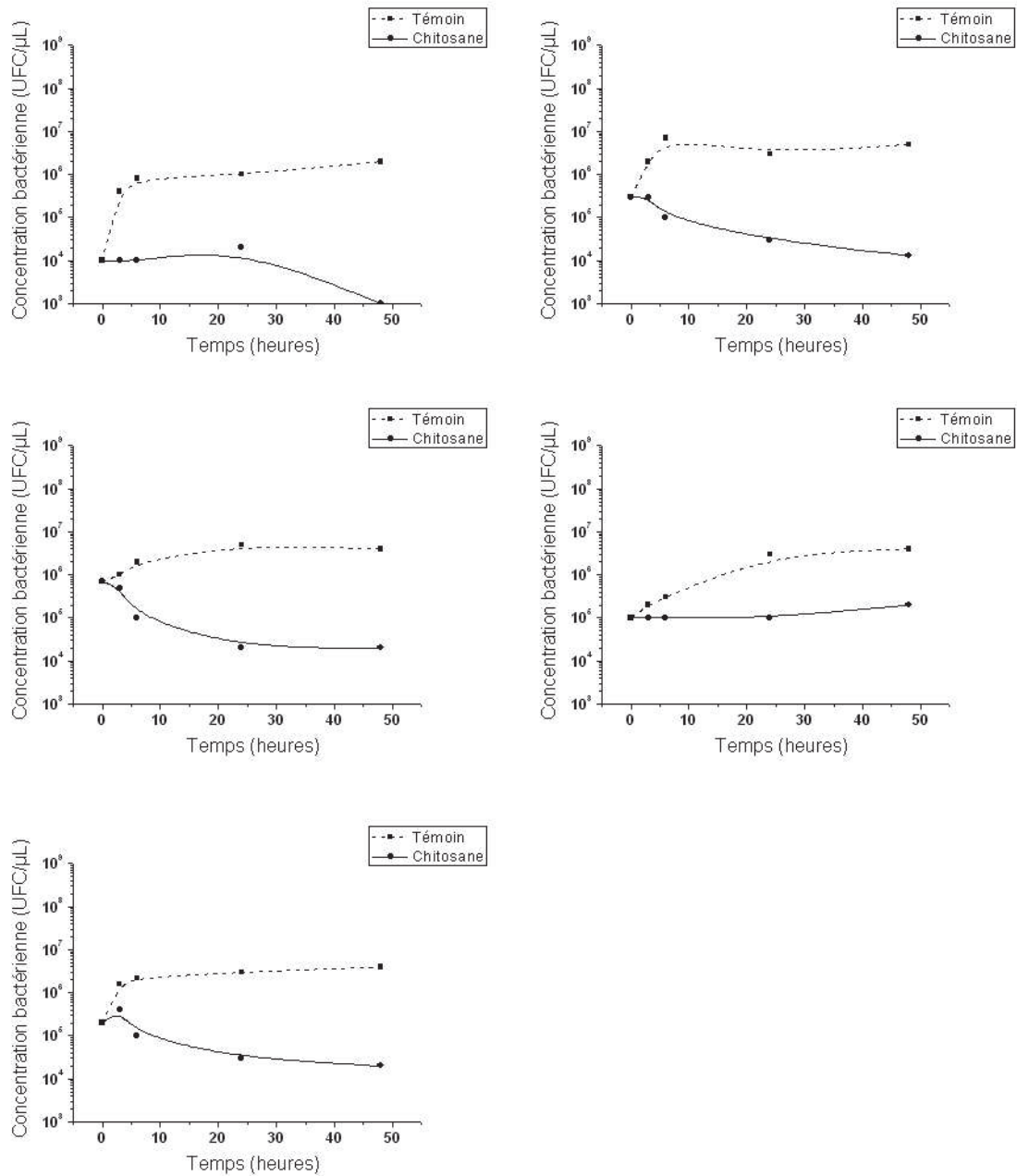


Figure 40 : cinétique de croissance bactérienne d'*Enterococcus faecalis*, l'essai a été répété 5 fois. (les courbes sont tracées pour faciliter la lecture des résultats)

Évolution du nombre de bactéries au cours des 48h		Comparaison du nombre de bactéries dénombrées en absence ou en présence de chitosane				
<i>Tube témoin</i>	<i>Dispersion d'hydrogel</i>	<i>T0</i>	<i>T0+3h</i>	<i>T0+6h</i>	<i>T0+24h</i>	<i>T0+48h</i>
<0.001	NS	NS	NS	0.008	0.008	0.008

Figure 41 : Résultats de l'analyse statistique. Test ANOVA et test Mann et Whitney (données non appariées). Valeurs de p obtenues pour 4 essais pris en compte.

3. Discussion et interprétation

La croissance bactérienne dans les tubes témoins a montré une évolution statistiquement significative dans tous les cas au cours des 48h de culture; ce qui nous permet de considérer que notre témoin et par conséquent l'étude sont valides. Toutefois nous attendions une croissance bactérienne plus importante (de l'ordre de $2\log_{10}$ en 48h), or dans la moitié des cas cette croissance, bien que significative, n'atteint pas cette valeur. L'explication la plus probable à cette croissance « ralentie » est l'absence d'agitation continue lors des temps d'incubation. En effet les tubes étant placés verticalement dans l'étuve à $T=37^{\circ}\text{C}$, un culot bactérien peut se former lorsque la concentration bactérienne devient importante dans le milieu. Les bactéries se trouvant prisonnières dans ce culot ne disposent pas d'un contact suffisant avec le milieu de culture pour en consommer les nutriments. Il en résulte un ralentissement puis un arrêt de leur croissance.

En ce qui concerne les tubes tests contenant les dispersions de broyats d'hydrogels de chitosane, il est nécessaire d'étudier chaque type bactérien indépendamment, les observations étant différentes selon la bactérie considérée.

Pour *Escherichia coli*, la croissance bactérienne se poursuit en présence de chitosane, mais l'analyse statistique des résultats a montré que la concentration bactérienne était significativement plus faible dans les tubes tests que dans les tubes témoins, et ce à tous les temps de prélèvement.

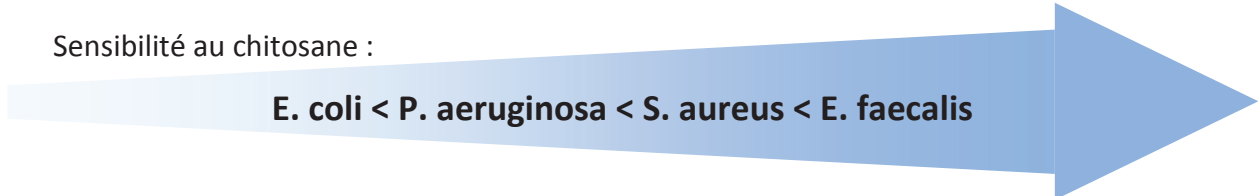
Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, l'effet bactériostatique des hydrogels est plus important, et l'analyse statistique de l'évolution de la croissance bactérienne

nous amène à penser que la bactériostase est totale. Cliniquement cela se traduirait par l'absence d'infection locale due à ce type de bactérie.

Pour *Enterococcus faecalis*, la diminution de la concentration bactérienne observée dans les tubes tests semble indiquer une action bactéricide des hydrogels de chitosane vis-à-vis de cette bactérie. D'un point de vue clinique, les hydrogels de chitosane empêcheraient le développement d'une infection locale due à la présence d'*Enterococcus faecalis* au niveau de la lésion.

D'après les résultats obtenus, et si on étudie individuellement les données obtenues au cours de chaque expérimentation, il semble que l'on puisse classer les bactéries étudiées par ordre croissant de sensibilité au chitosane, de la manière suivante :

Sensibilité au chitosane :



E. coli < P. aeruginosa < S. aureus < E. faecalis

Rappelons que *E. coli* et *P.aeruginosa* sont des bactéries de type Gram négatif, tandis que *S. aureus* et *E. faecalis* sont des bactéries de type Gram positif.

La structure élémentaire de la membrane externe des bactéries est composée, comme une membrane biologique classique, d'une double couche de phospholipides incluant des protéines. Dans le cas des bactéries Gram +, la couche externe est une couche épaisse d'un réseau hydrogel de peptidoglycane ou muréine, qui recouvre la couche phospholipidique. La composante polysaccharidique est un copolymère alterné de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique liés par des liaisons osidiques $\beta_{1\rightarrow4}$. La partie peptidique est formé par quelques acides aminés (L-Alanine, Acide D-Glutamique, L-Lysine, D-Alanine pour *Staphylococcus Aureus*; L-Alanine, Acide-D Glutamique, Acide diAminoPimélique, D-Alanine pour *Echerichia Coli*). Cette structure peptidique latérale joue un rôle clef dans la réticulation du réseau de peptidoglycane grâce à des ponts polypeptidiques (fig 42).

Dans le cas des bactéries Gram-, la double couche interne de phospholipides est également recouverte d'une couche de peptidoglycane, mais beaucoup plus fine, et cette couche est elle-

même recouverte d'une deuxième double couche de phospholipides incluant des protéines, mais également une endotoxine lipopolysaccharidique caractéristique de ce type de bactérie (figure 42).

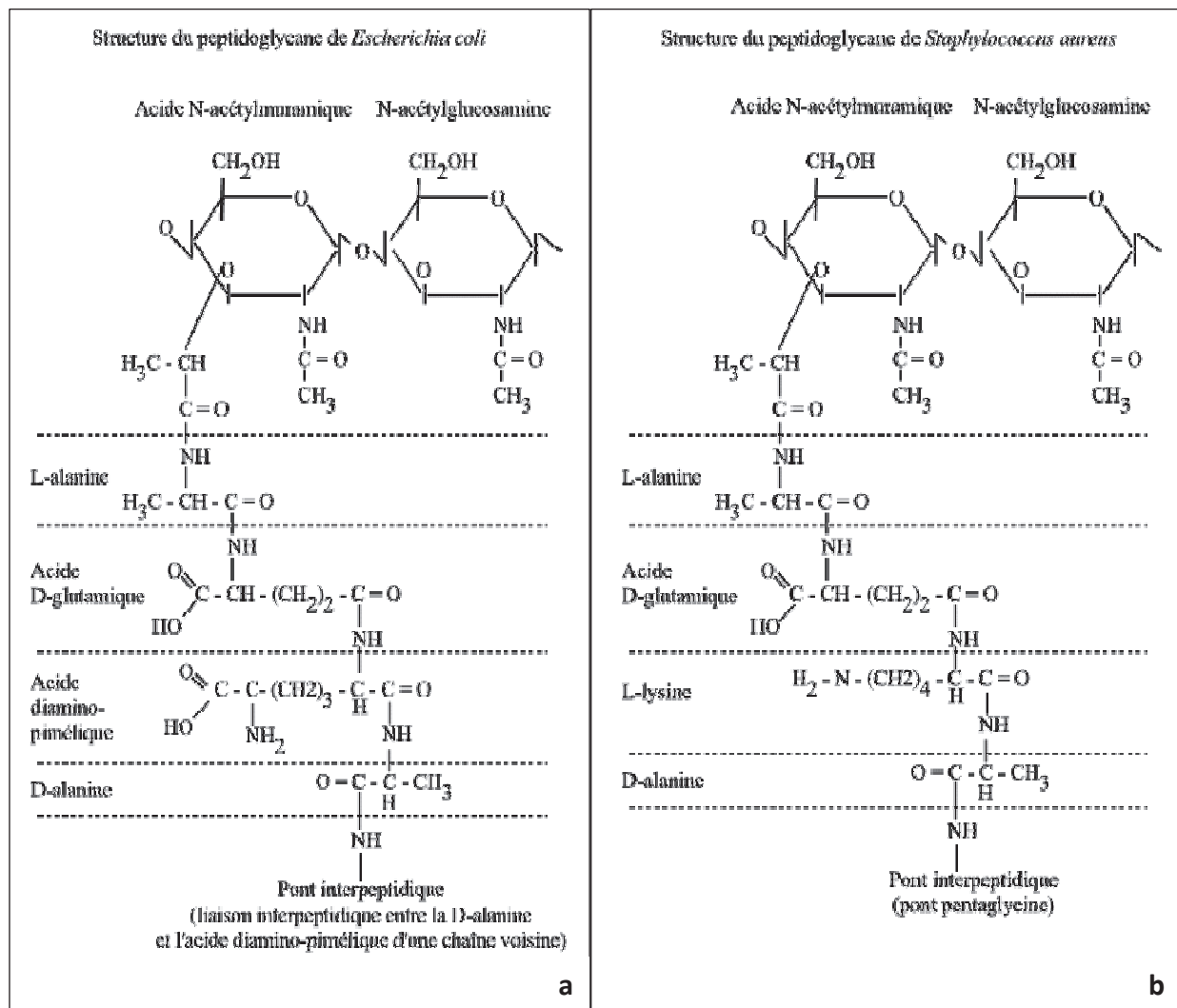
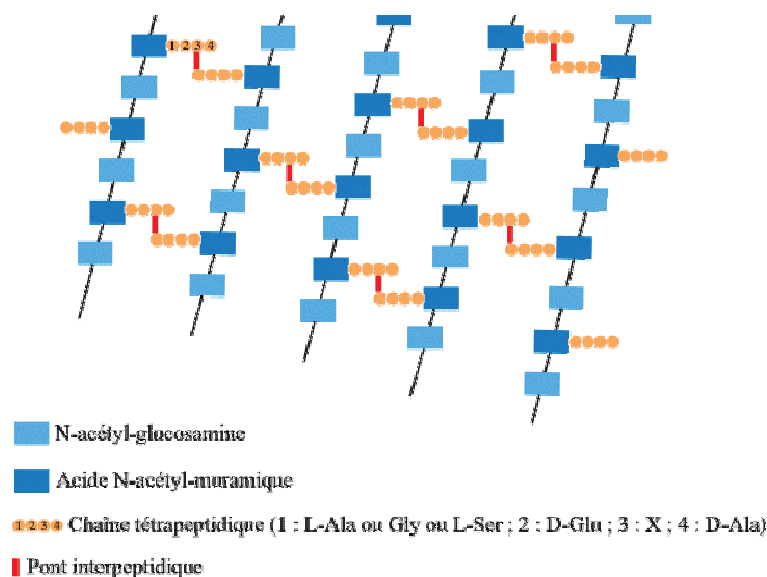


Figure 42 : (a,b) Structure de la muréine constituant l'enveloppe externe d'*Escherichia coli* (gram-) et de *Staphylococcus aureus* (gram+). La structure est sensiblement la même pour toutes les bactéries : la composante polysaccharidique est un copolymère alterné de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, la partie peptidique liée à l'acide N-acétylmuramique est formée par 4 acides aminés (c'est la nature de ces acides aminés qui varie selon les bactéries) ;



c

Figure 42 : (c) Des ponts interpeptidiques unissent entre elles les unités tétrapeptidiques. Ils s'établissent généralement entre le dernier acide aminé d'un tétrapeptide et le troisième acide aminé d'un tétrapeptide de la chaîne voisine pour former un réseau polymère de peptidoglycane.

Nous avons évoqué précédemment que le mode d'action du chitosane le plus décrit dans la littérature est la formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane (transformation des motifs NH_2 en NH_3^+) et les phospholipides de la membrane cellulaire des bactéries. Ces interactions électrostatiques conduisent à l'augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne et donc à une perte de matériel protéique. D'autre part, le chitosane est susceptible de se lier avec les protéines du cytoplasme bactérien, ce qui conduirait entre autre à l'inhibition de la synthèse de l'ARNm (bien que la capacité du chitosane à pénétrer dans le noyau cellulaire soit très discutée).

La formation de ces interactions électrostatiques est envisageable dans le cas des bactéries Gram- du fait de la nature phospholipidique de la couche externe. Toutefois dans le cas des bactéries Gram+, du fait de l'épaisse couche de peptidoglycane qui recouvre la couche phospholipidique, il faut envisager une autre hypothèse.

On peut penser que des interactions plus spécifiques s'établissent entre le chitosane et le réseau de muréine. En effet, si l'on considère le pH du milieu, une large fraction de groupements amines du chitosane doivent se présenter sous forme non protonnée ($\text{pK}_a \sim 6.5$). Pour invoquer une interaction mureine-chitosane, il doit donc exister des mécanismes

d'interaction non électrostatiques. La partie polysaccharidique de la mureine (neutre) présente des analogies structurales fortes avec la chitine. Elle est donc susceptible d'interagir avec le chitosane en participant au réseau physique avec établissement de nombreuses liaisons hydrogène (impliquant le groupement acétyl et les hydroxyles) et des interactions hydrophobes. Les effets bactériostatiques observés vis-à-vis des bactéries de type Gram+ peuvent s'expliquer par les interactions mureine-chitosane qui conduiraient à l'agrégation des bactéries à la surface des particules d'hydrogels.

Cette hypothèse est en accord avec les observations de Barany et al. qui ont mis en évidence la contribution de facteurs non électrostatiques dans les phénomènes de floculation bactérienne en présence de chitosane [1]. Parmi ces facteurs, les auteurs évoquent la probable formation de « pontages » entre les bactéries via le polymère adsorbé à leur surface.

Ce phénomène d'agrégation bactérienne à la surface des broyats de gel peut aussi être envisagé pour les bactéries de type Gram- dans le cadre de la formation d'interaction phospholipides-chitosane.

Les différences structurales importantes existant entre les membranes des bactéries selon qu'elles soient de type gram- ou gram+ impliqueraient donc deux mécanismes d'action antibactérienne différents et expliqueraient la sensibilité différente de ces deux types de bactéries vis-à-vis du chitosane.

4. Conclusions

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la présence de particules microniques d'hydrogels physiques de chitosane sur la croissance de bactéries responsables de surinfections cutanées au niveau des sites cicatriciels, et plus particulièrement lorsqu'il s'agit de brûlures.

Les hydrogels de chitosane ont montré une activité bactériostatique pour les quatre types bactériens testés dans les conditions de concentrations choisies : 1% en masse de chitosane dans le milieu. Le caractère antibactérien des hydrogels semble plus important dans le cas des bactéries à Gram positif, phénomène que l'on peut relier à une interaction microorganisme-

microgel et à d'autres mécanismes d'action du chitosane précédemment décrits dans la littérature.

On notera que si l'action du chitosane dans les conditions de culture est moindre pour les bactéries Gram-, une application antibactérienne est tout à fait envisageable, puisque le pouvoir perméabilisant du chitosane envers les membranes bactériennes devrait sensibiliser les bactéries à de nombreux autres agents extérieurs.

Les hydrogels de chitosane sont donc particulièrement intéressants dans le cadre d'une utilisation conjointe avec d'autres agents de type antibiotique, selon un concept de synergie. Une telle démarche permettrait aussi de limiter la quantité d'antibiotiques consommée, et donc de limiter le développement de résistances bactériennes qui constitue un grave problème en milieu hospitalier.

Par ailleurs les résultats de notre étude sont encourageants du fait de la faible quantité de chitosane contenue dans le milieu : en effet les hydrogels physiques de chitosane bicouches développés dans le cadre de notre étude de cicatrisation contiennent 3% en masse de chitosane, et on peut donc s'attendre à une activité anti-microbienne plus importante encore à leur contact que celle observée dans les milieux de culture durant cette étude.

Enfin il serait intéressant d'étudier maintenant l'activité antibactérienne des hydrogels face à des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques et faces aux champignons responsables de pathologies cutanées comme le *Candida albicans*.

Le mécanisme d'action bactériostatique pourrait également être précisé par observation microscopique d'hydrogels en présence de bactéries gram+ ou gram-, de façon à repérer des indications morphologiques de la croissance bactérienne (encapsulation des particules hydrogels par les bactéries?). La taille des particules d'hydrogel influence également la surface offerte pour l'interaction hydrogel-avec le milieu bactérien: c'est un paramètre qu'il faudrait également préciser et relier à l'effet bactériostatique.

2^{ème} partie : Étude à long terme de la cicatrisation de brûlures en présence d'hydrogels physiques de chitosane

Cette partie concerne l'utilisation pour la cicatrisation thérapeutique de brûlures du 3^{ème} degré des hydrogels physiques de chitosane dont le procédé d'élaboration a été décrit dans la première partie du chapitre « Matériels & Méthodes ». Les résultats présentés ici ont été obtenus grâce à la collaboration des équipes de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, du Centre de Recherches des Services de Santé des Armées et du laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères.

L'étude bibliographique a montré que la principale difficulté est de parvenir à la reconstruction du tissu dans son intégralité (épiderme, derme, annexes dermiques et épidermiques) et d'éviter la formation de cicatrices hypertrophiques inesthétiques.

Les hydrogels bicouches de chitosane ne contiennent aucun matériel cellulaire, et sont donc plutôt destinés à des brûlures profondes peu étendues. Pour ce type de plaies, on peut envisager une autogreffe, mais celle-ci implique des gestes chirurgicaux complexes, des délais de soin importants et une cicatrice supplémentaire au niveau du (ou des) site(s) donneur(s). En effet, les systèmes issus de cultures cellulaires nécessitent des délais importants, et la manipulation de ces dispositifs est complexe avec des installations spécifiques, qui notamment ne peuvent être mises à la disposition des militaires engagés sur le terrain, à moins d'engager des investissements très lourds.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les propriétés bioactives du chitosane ont été largement décrites, il en est de même pour ses propriétés antibactériennes, même si les mécanismes d'action biologiques sont mal connus et dépendent pour une part de la forme physique présentée au milieu vivant.

Sous la forme d'hydrogel, nous avons pu montrer que le chitosane présente également des propriétés anti-microbiennes. Quant à leur bioactivité, Montembault et al. ont montré leur intérêt des hydrogels physiques pour la régénération du cartilage [2], Chaussard et al. dans le domaine du comblement osseux et pour la réalisation d'implants pariétaux [3], Ladet

et al. pour une utilisation de ces mêmes hydrogels en tant que bioréacteurs multimembranaires [4].

En ce qui concerne la cicatrisation cutanée, la preuve de concept apportée par Boucard *et al.* a montré que les hydrogels de chitosane ont des propriétés cicatrisantes à court terme qui méritent d'être confortées et étudiées de manière plus précise. C'est dans cette perspective qu'a été mise en place l'expérimentation E1, d'une durée totale de un an et menée chez le porc nain, dans le but d'évaluer l'impact de la présence des implants hydrogels de chitosane à la fin de la période de remodelage, en évaluant la qualité du tissu cicatriciel à long terme à la fois d'un point de vue fonctionnel, mécanique et esthétique.

L'ensemble du protocole expérimental ayant été décrit dans le chapitre précédent, seuls les résultats seront présentés ici. Ces résultats font l'objet d'une publication, retranscrite ici dans une mise en page similaire au reste du manuscrit.

Multilayered physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. Long term evaluation of the scar quality.

F. Dupasquier¹, L. David¹, Claude Carozzo², D. Pin², D. Agay³ and Y. Chancerelle³

¹ Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) UMR CNRS 5223, Laboratoire IMP@Lyon1, Bât. EPU Lyon 1, 15, bd Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex France.

² RTI2B, Department of Surgery VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile.

³ Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Av. du Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche Cedex, France.

1 Introduction

The skin acts as a protective barrier against environmental aggression and the loss of its integrity can have serious consequences on health. In the case of burn injuries, the first issue to overcome is the important risk of wound sepsis. Improvements in wound depth evaluation and early surgical excision of burned tissues have improved patient outcomes; however, even when burns are not life-threatening, quality of care is decisive to prevent from unaesthetic and/or unfunctional scar formation.

In a previous paper, we proposed a new acellular biomaterial made of physical chitosan hydrogels [1]. Results obtained during a preliminary *in vivo* experiment on third degree burns healing demonstrated that these biomaterials were well accepted by host organisms, and that they allow complete skin regeneration. The long term evolution of tissue and its aesthetic and mechanical properties have remained to be evaluated.

The present study is a one year wound healing experiment after third degree burn during which we aimed to assess skin quality when regenerated with the permanent bilayered chitosan physical hydrogels dressing previously described [1], in comparison with conventional dressing (Tulle Gras®). *In vivo* and *ex vivo* tensile tests were performed on scars and native tissues thanks to a microtensile test machine developed in the laboratory. Clinical observations as well as histopathological data are presented comparing wound healing with a conventional dressing material (Tulle Gras®) versus chitosan hydrogels.

2 Materials and methods

2.1 Chitosan hydrogels preparation

Purification of chitosan

We used chitosan flakes from squid pens and purchased by Mahtani Chitosan (batch n° 113). In order to purify the polymer, flakes were dissolved at 0.5% (w/w) in presence of an amount of acetic acid necessary to achieve the stoichiometric protonation of the $-NH_2$ sites. The solution obtained was filtered on 3, 1.2 and 0.45 μ m Millipore membranes. The polymer was then fully precipitated by the addition of ammonium hydroxide (28% (w/w)). After several washings in deionised water and centrifugation steps until a neutral pH was achieved, chitosan was lyophilized. The product obtained was a chitosan of low DA (about 1.5%), high molecular weight (M_w close to 500 000 g/mol evaluated by SEC [1]), and a water content of about 10%.

Preparation of bi-layered hydrogels

Freeze-dried purified chitosan lyophilisates were sterilized by a 20 minutes autoclaving stage at 121°C. All tools, accessories and containers were also previously sterilized with high-temperature water steam. Solution at 3% (w/w) of chitosan chlorhydrate were prepared in a laminar flow hood with sterilized deionised water and a stoichiometric amount of hydrochloric acid (37% in water) necessary to achieve the protonation of all $-NH_2$ sites. The complete dissolution of polymer was obtained after about 8 hours of mechanical stirring.

Bi-layered physical hydrogels were then prepared as described by fig. 1: a first layer of hydrogel was obtained from an initial hydroalcoholic mixture of chitosan chlorhydrate solution (3% w/w) and 1,2-propanediol in a 1/1 ratio. After the complete evaporation of water (corresponding to a half-weight loss) obtained after a drying thermal treatment in an oven at 50°C, we obtained an alcogel [2]. Then the aqueous solution of chitosan chlorhydrate (3% w/w) was poured onto the alcogel. Finally the whole system was placed in gaseous ammonia which is able to diffuse both through the alcogel and the solution. This step led to the gelation of the solution layer as previously described [1,3], and to the neutralization of the alcogel. Several washings in sterilized deionised water ensured the elimination of 1,2 propanediol from the alcogel on the one hand, ammonium chloride and excess of ammonia from both layers on the other hand.

The final device is composed of two 4 mm thick layers containing only chitosan and water (fig. 2), but differing in their morphology [4] and mechanical properties. The softer gel is the gel obtained from the direct neutralization of the aqueous solution; a harder gel is resulting from the alcogel route [1]. The device's shape is determined by the shape of the chosen container but can be easily adjust to the exact wound's shape by the use of a scalpel. For our experiment, burns were square-shaped so we chose square containers, whereas hydrogel showed in fig. 2 was prepared in cylindrical Petri dish.

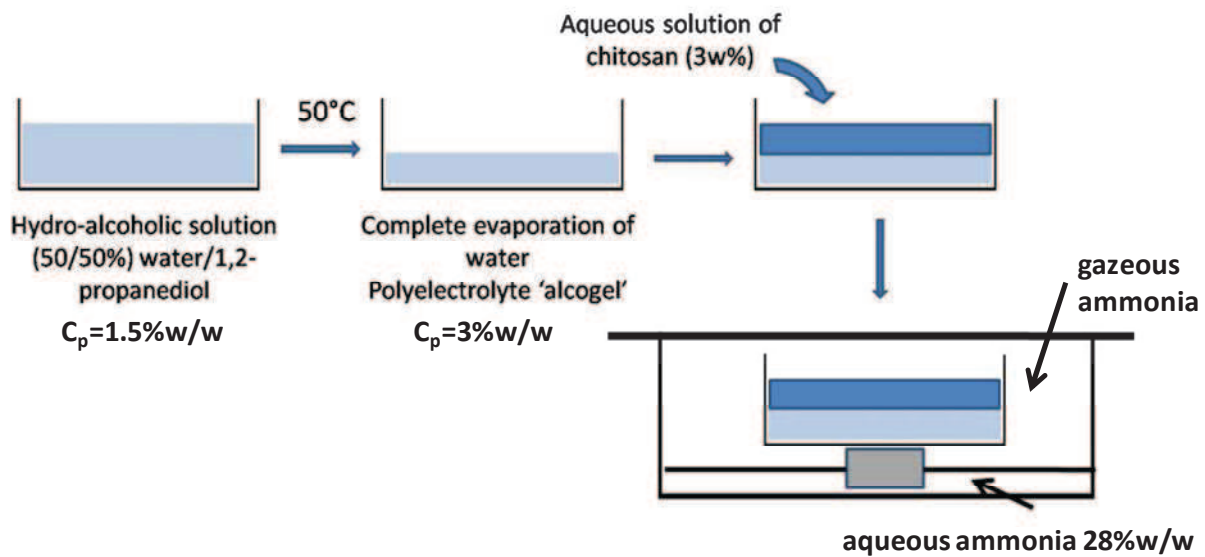


Fig. 1: Scheme of the preparation of bilayered chitosan hydrogel

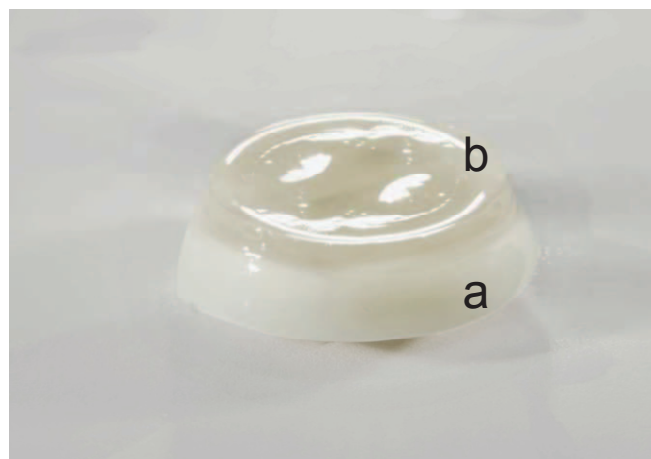


Fig. 2: Bilayered chitosan physical hydrogel prepared in cylindrical Petri dish. (a) soft hydrogel layer obtained by aqueous gelation route (wound side) ; (b) Rigid hydrogel layer obtained by hydroalcoholic gelation route (upper side).

[Photograph courtesy by Oram Dannreuther, OSD photography]

2.2 *In vivo* experiment

Animal care

In order to validate the interest of bi-layered chitosan physical hydrogels (BCPH) for skin repair after 3rd degree burn, the experiment was performed using an *in vivo* pig model. In accordance with ethical guidelines established by the National Institute of Health, the procedures were first approved by the Animal Ethics Committee of the National Veterinary School of Lyon. Five female Göttingen mini-pigs weighing about 20 kg were purchased from Ellegaard (Dalmose, Denmark). They were quarantined for 2 weeks before the experiment and daily handled during this adaptation period to allow further stress minimization. Animals were housed in small individual boxes in accordance with the legislative standards prescribed by French Ministries of Agriculture and Environment.

Experimental thermal injury

The aim of this study was to evaluate the long term impact of BCPH on the scar quality after deep burn injury. Premedication with Vetranquil (0.1 ml/kg) was administered to the mini-pigs twenty minutes before an intra-muscular injection of Imalgene-Rompun® (10mg/kg ketamine + 2mg/kg xylazine). Anesthesia was maintained by a gaseous procedure (Isoflurane 2.5% on 100% O₂). Before the burns, reference lines were tattooed to mark the areas to burn and to ensure a good follow of wound contraction (fig. 3a). Then four square burns were performed under deep anesthesia on the back of each animal: two in the caudal thoracic area and two in the lumbar area. The 5x5 cm² burns were realized by the application, during 30 s, of a cubic copper piece heated at 100°C, with a controlled pressure on the skin of 8 kg/cm² (fig. 3b). In order to avoid variations in creating the burns, one person created them all. This protocol leads to a third degree burn of the skin, without lesion of underlying muscles according to previous experiments (unpublished data). During burn injury, heat was conducted down to deeper dermis that was then later damaged. This is the reason why an immediate burned tissue resection is usually performed. In the present study, surgical resection was intentionally performed two days after burn injuries to be in the worst clinical conditions of skin damage, with no possible self-induced regeneration of the tissue.

To avoid any pain after 3rd degree burns, analgesia was provided by an immediate post-surgical injection of 10 mg of morphine (Morphine AguettantND) and by a patch releasing 50µg/h of Fentanyl (DurogesicND), replaced every 3 days during the first 20 days. Any topical or systemic antibiotics were administrated during the experiment to prevent any kind of interference with healing process.

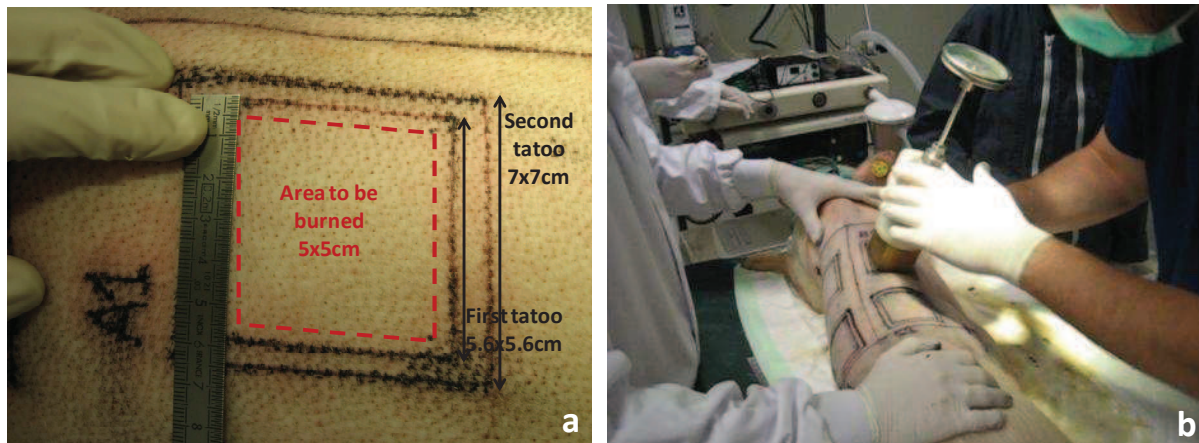


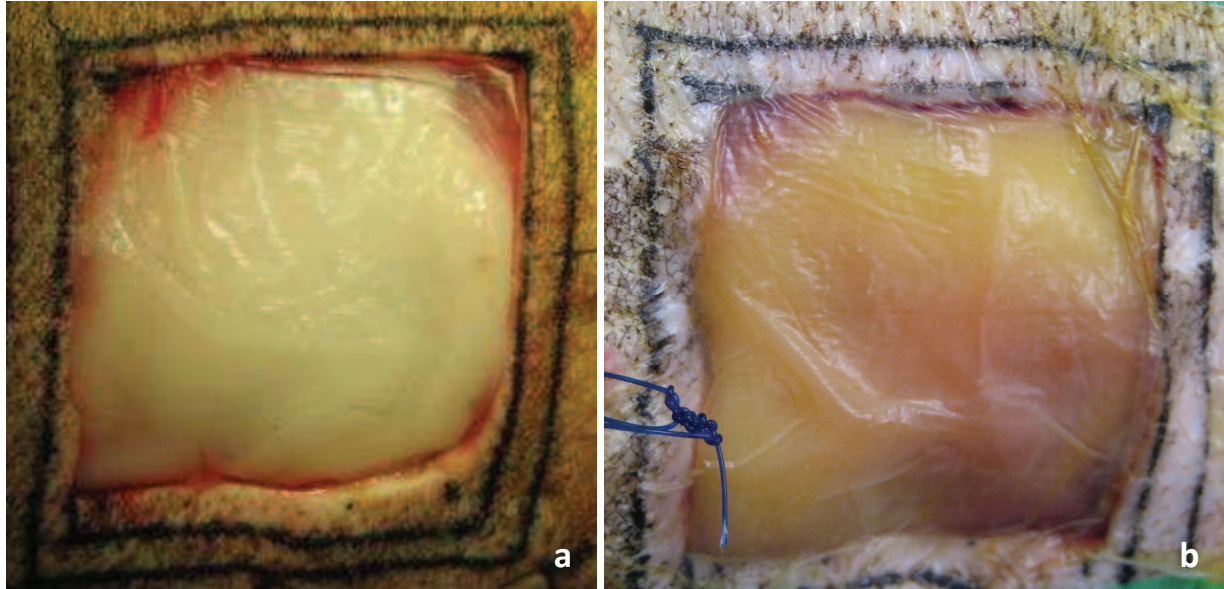
Fig. 3: (a) reference lines tattooed before burns. Surgical resection has been processed between burn edge and first tattooed line, the second line allowed scar contraction follow; (b) burns induced by the application of a copper piece heated at 100°C, with a controlled pressure of 8kg/cm²

Study design

Two days after burn injury, the necrotic tissues were removed by surgical resection of the four burned areas of each animal.

The surgical areas were then covered by two different devices randomly displayed on each wound area, to ensure a double blind evaluation of healing advancement: two lateral wounds were filled with BCPH after adjustment of their shape to that of the resection zone (fig. 4) and the two contralateral others with Tulle Gras[®]. A complementary wound dressing composed with a polyurethane micro-porous film (Tegaderm[®]), sterile compresses and Elastoplast[®] was used to protect and keep devices in position. The wounds were controlled every two days during all the healing period. A key point in this study was to keep chitosan hydrogels in place until complete epithelialization whereas only Tulle Gras[®] was replaced every two days. Hemorrhage due to resection was limited by the use of electrocautery. A limited amount of blood could therefore have penetrated into the hydrogels, especially the softer part (see figure 4a). The exudates penetrated within structure of both hydrogel layers later during the reconstruction phase of the dermis and epidermis (fig. 4b). During the year after injury, clinical investigations were

performed in the five mini-pigs: weight control, burn area measurement, assessment of skin mechanical properties (durometry measurements, *in vivo* and *ex vivo* tensile tests). For each animal, skin biopsies were collected on healthy skin and in burned areas, after seven months from the two front wounds, and after 12 months from the two back wounds, in order to allow histological investigations.

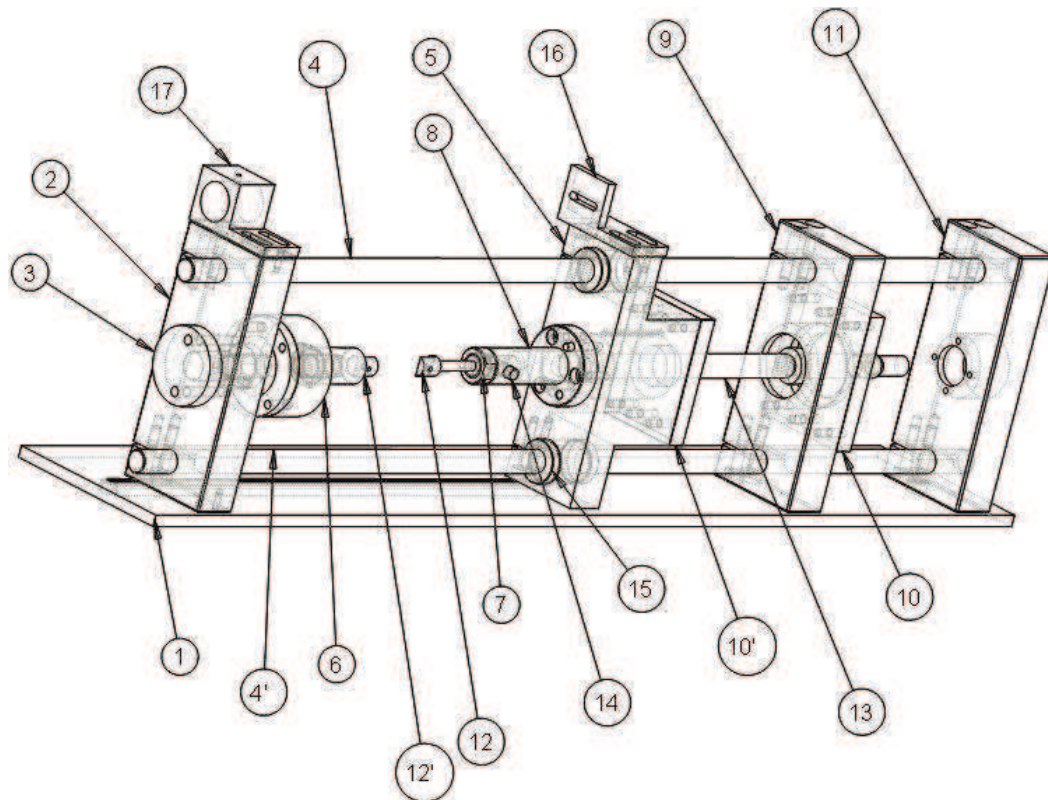


*Fig. 4: (a) implantation of chitosan hydrogel in surgical defect (day 0)
(b) Implanted hydrogel at day 7: exudates have penetrated hydrogels. (on this photograph, the hydrogel is covered by a polyurethane film. The blue thread is a suture used to maintain complementary dressing, especially sterile compresses during animal moves)*

Mechanical testing

In vivo tensile tests were performed thanks to a specific device developed in the laboratory (fig. 5a). This device is composed of a micro tensile test machine and two swerved metallic pads fixed to a displacement device. To avoid any flexion stress on the load cell, a rod/ball-bearings system has been used in order to guide pads' displacement (fig. 5b).

The distraction pads (see figure 5c) are stuck on the pig skin at a distance of 10mm, thanks to cyanoacrylate glue (Loctite Super Glu 3). These pads are connected to a 100N load cell (HBM U2B), and a LVDT strain sensor (Sensorex). Loading/unloading cycles with maximum force 10N were conducted at a cross-head speed of 2 mm/min.



1	Support plaque	10	Covers
2	Fixed cross-head (stainless steel)	11	Gear box bearing flange
3	Force flange (stainless steel)	12	Clamps
4	Shaft (stainless steel)	13	Planetary roller screw INA RGT 12 series
5	Mobile cross-head (stainless steel)	14	Cotter Ø 6mm
6	Force Transducer HBM USB 100N	15	Ball bushing Ø int 12mm Bosch Rexroth R0600 012 00
7	Locknut	16	Support for LVDT push rod
8	Tubular clamp support	17	LVDT mounting block
9	Fixed Cross-head		

Fig. 5a: General scheme of tensile-test machine. The DC motor (Portescape 28L28-416E.49) and gearbox (Portescape R32.0138) are not represented for clarity.

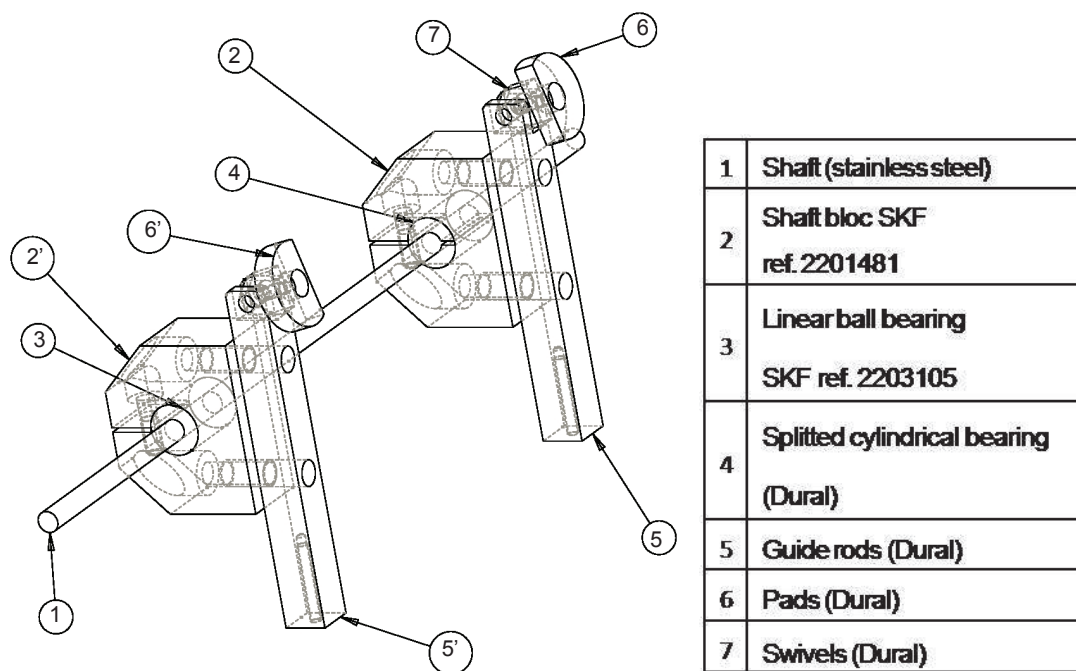


Fig. 5b: Rod/balls-bearings system used to swerve pads in order to avoid flexion stress on load cell.

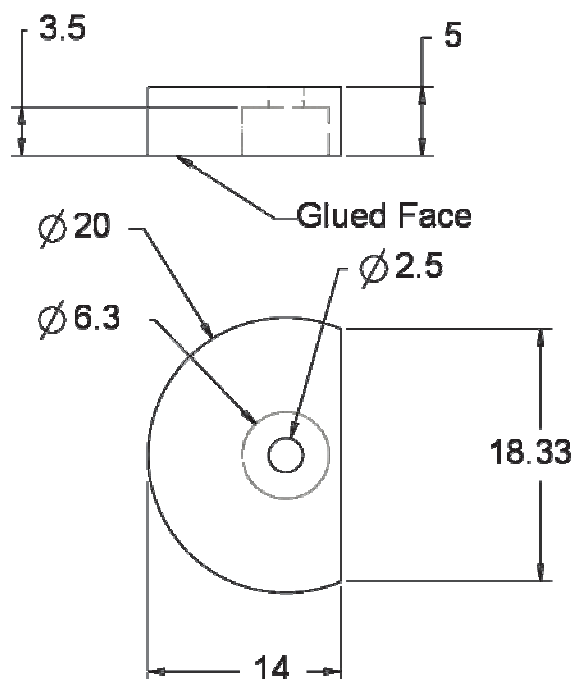


Fig. 5c: Geometry of aluminum pads stuck on pigs' skin for in-vivo tensile tests.

There is no standard procedure for the estimation of the mechanical properties of the cutaneous tissue by distraction experiments. In this work, a variety of experimental parameters such as the pad shapes and sizes, the cross-head speed were not investigated in details and will not be addressed here. In addition, the peripheral force contribution due to the deformation of surrounding tissues will not be discussed [5]. The experiments are carried out for comparison purposes.

In vivo results were displayed as the load vs. nominal strain ($\Delta\ell/\ell_0$ with $\Delta\ell=\ell-\ell_0$, where ℓ is the distance between the two pads stuck on the skin and ℓ_0 the initial distance). The results obtained with each scar were compared with those obtained with native skin evaluated close to the studied scar. We indeed observed that mechanical properties are significantly different depending on the localization of the tested skin on the back of the animals.

Ex vivo tensile tests were also performed on resected skin strips of approximately 10mm wide and 24 mm long. The gauge distance between clamps was close to 10 mm, so that the area stretched was 100 mm². Two load/unload cycles were performed at a cross-head speed of 2 mm/min until the maximal loads of 50 N and 90 N respectively.

Ex vivo tensile tests are displayed as average stress (defined as the ratio of the load on the cross-section of the sample) vs. nominal strain.

To assess skin hardness, a Shore O durometer (Hildebrand – HD3000) was used to measure native skin and scars hardness. Five measurements were performed on each tested area, immediately after the application of the indenter.

Histology

For histological analyses, the skin biopsies were fixed in 10 % phosphate buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned, and stained with HE for cellular content evaluation. Periodic Acid Schiff (PAS) staining and several specific antibodies were used for an immuno-histochemical study of regenerated skin (*table 1*). All antibodies were tested before the experiment on pig native skin biopsies to assess their specificity, which could have been different from specificity usually observed for human tissues.

After re-epithelialization of wounds, the external and remaining part of chitosan hydrogels that was not integrated in the wound dried and finally separated from the reconstructed tissues. These dry residues were collected and also studied after by histology to a better understanding of the interaction mechanisms between the tissues and the BCPH implants.

Stainers and antibodies	Specificity
PAS	Basal laminae
AE1-AE3	All kind of cytokeratins
Ki 67	Dividing cells (cell multiplication index)
Bla36	B cells and dendritic cells
CD3	T cells
HM57	Macrophages
S100 Protein	Langherans cells, dendritic cells, Schwann cells
Factor VIII	Endothelial cells
Collagen IV	Basal laminae

Table 1 : Immuno-histochemical antibodies and their specificity for the histology studies

3 Results

3.1 Burn injuries

In a first step, the effect of the application of the burning device was studied by histology examination of the sections of burned skin collected immediately after the burn, with hemalun and eosin (HE) staining (fig. 6). The burn protocol effectively induced a 3rd degree burn, since epidermis and upper dermis were completely destroyed: no cell could be observed in the burnt tissue, and collagen fibers bundles were hardly identifiable anymore. Deep blood vessels had an abnormal homogeneous aspect and endothelial cells could not be identified. Cracks in hair bulge indicate that deep dermal hair follicles and glandular structures are also damaged.

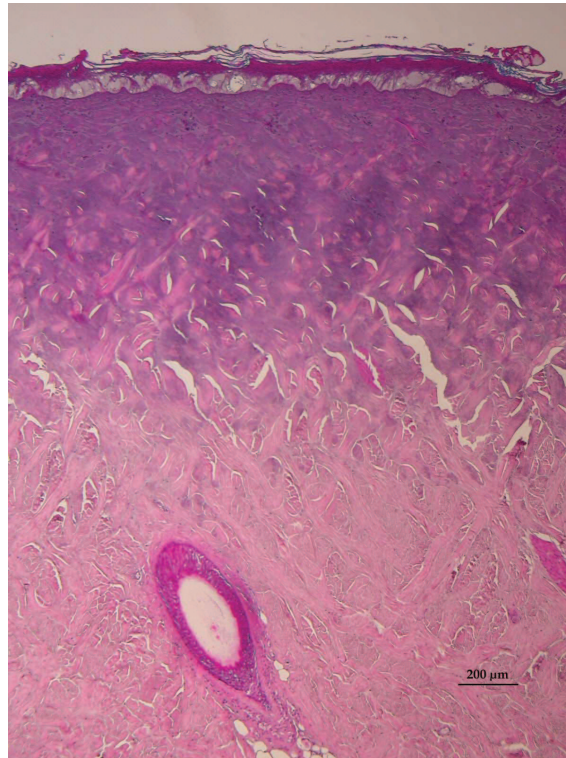


Fig. 6: Hemalun-Eosin stained sections of burned skin, immediately after the injury. No cell can be observed and collagen fibers bundles are hardly visible. Epidermis and upper dermis appear completely destroyed. Deep dermal hair follicles and glandular structures are also damaged since there are cracks in hair bulge.

3.2 Clinical observations during wound healing

During the year after burn injury, scars were observed and measured every two days during the first month, then once a week, and then once a month from the fourth month of the experiment up to one year.

During the first days of healing, dermis regenerated and filled the surgical hole, in particular those containing the bi-layered hydrogels. Then, epithelialization of treated wounds occurred from the borders of the wound with both with Tulle Gras[®] and BCPH treatments. After re-epithelialization (namely after about 20 days), the remaining part of the BCPH dried since they weren't in contact with biological fluids anymore, and finally fell out. Wounds were then only covered by Tegaderm[®], compresses and Elastoplast[®]. Tulle Gras[®] was maintained on reference wounds during the first month, and then were only covered by Tegaderm[®] and Elastoplast[®].

Whatever the treatment, scars appeared retractile (fig. 7 and 8): about 40% contraction of the burn area appeared during the first month, lightly higher with BCPH. As shown by figure 7, retraction induced X-shaped scars with a higher retraction in the sagittal direction. Then retraction stopped during the second and third month of healing, and then decreased because of the counterbalancing effect of the growth of the animals, as shown by the evolution of reference area surface.

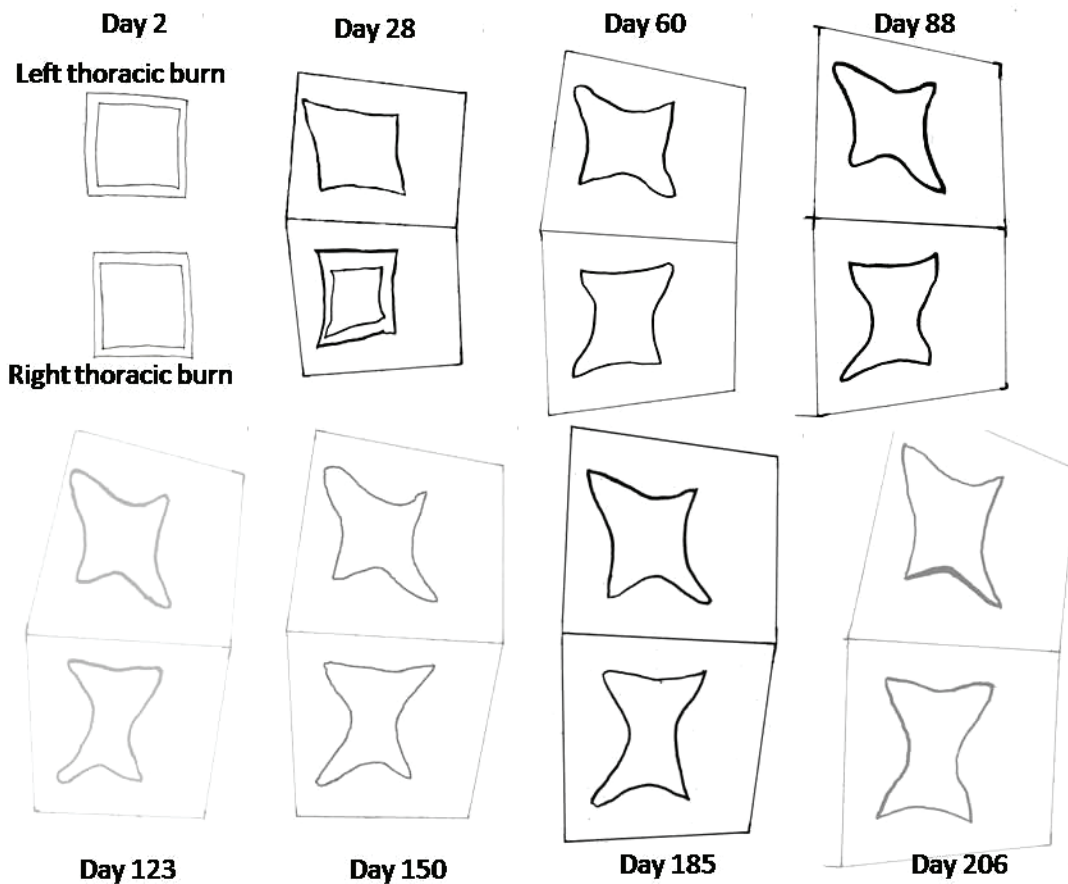


Fig. 7: traced tattoo (2nd line) of the two thoracic wound areas during the first 206 days of healing. A similar contraction of scar tissue was observed with Tulle Gras® (left burn) and BCPH (right burn).

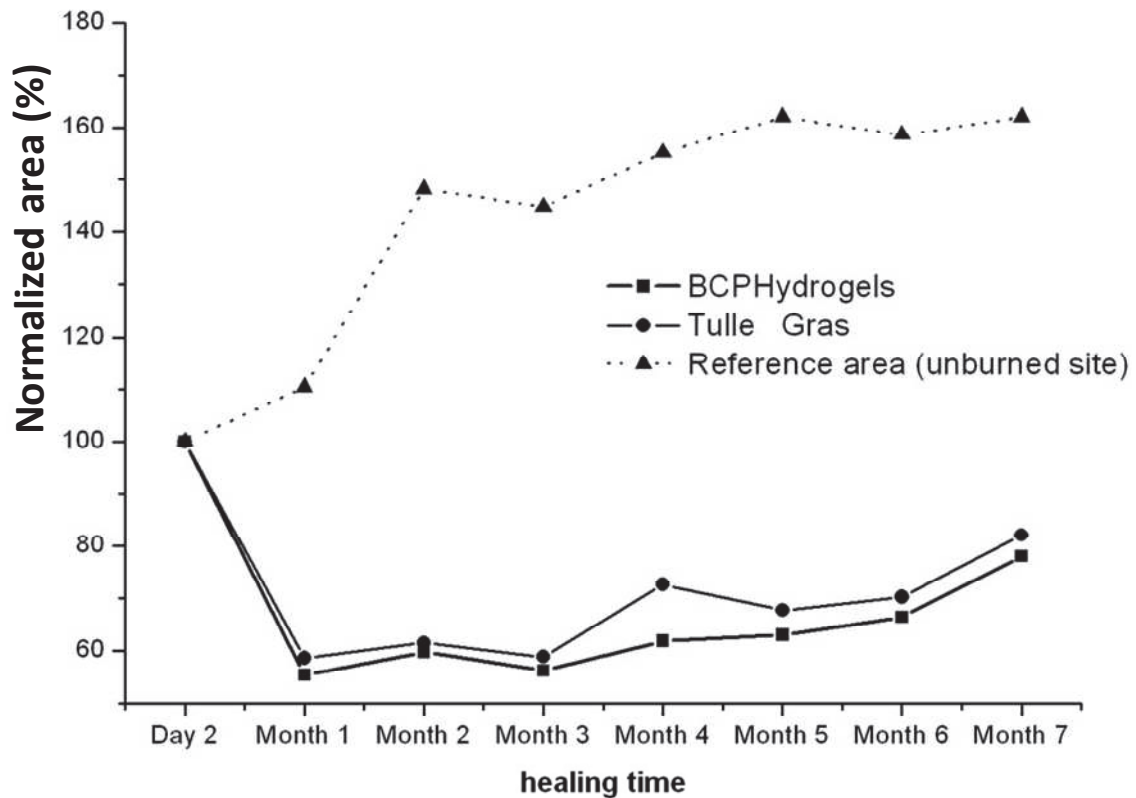


Fig. 8 : Evolution of mean scar surface (n=5) during the first seven months normalized by the scar surface measured at day 2 for BCPH and Tulle Gras® treatments. The reference area displays an increase due to animal growth.

Chitosan hydrogels were remarkably well accepted by host organism, i.e. no irritation or pain or harmful effect on the biological functions was clinically observed which confirmed Boucard et al. observations during their preliminary experiment. Although BCPH and Tulle Gras® dressings induced a comparable retraction, the scars obtained with chitosan hydrogels appeared significantly softer or smoother by skin pinching manual examination. These somewhat subjective observations were confirmed by several *in vivo* and *ex vivo* mechanical analyses.

3.3 Mechanical properties of regenerated skin

Durometry

Durometry was performed on the scars and native control skin 12 months after the burn. Native skin gave the lowest hardness values, indicating that the native tissue is more compliant in compression perpendicular to the cutaneous plane.

The regenerated skin obtained with BLCP hydrogels showed lower hardness values than tissues obtained with Tulle Gras® (table 2). A Wilcoxon rank sum test performed on the BCPH and Tulle Gras® treated scars series exhibited a p-value close to 0.63, indicating that the difference, although observed, is not highly significant.

Each shown result is an average of five measurements performed on each area. The measurements exhibited relatively high dispersion and were impaired by anatomic parameters, especially the presence or absence of the ribs under the tested area which affect the depth of indentation. Moreover the results were impacted by the width of underlying hypodermis subcutaneous tissue that varied between individual and impacts on the measured hardness.

	Native Skin	Chitosan hydrogel treatment	Tulle Gras® treatment
Pig 1	27 (\pm 4)	32 (\pm 5)	37 (\pm 6)
Pig 2	27 (\pm 5)	44 (\pm 4)	50 (\pm 3)
Pig 3	35 (\pm 5)	41 (\pm 6)	48 (\pm 3)
Pig 4	19 (\pm 5)	25 (\pm 3)	28 (\pm 4)
Pig 5	34 (\pm 4)	35 (\pm 12)	29 (\pm 5)
Mean	28.4(\pm 1)	35.4(\pm 1.2)	38.4 (\pm 1)

Table 2: Shore O durometry results obtained after one year of healing. (Shore units 0-100) with standard deviation.

***In vivo* tensile tests**

Figure 9 displays an example of a mechanical characterization with two successive hysteresis loops, the tensile axis corresponding to the sagittal direction. The loading curves exhibit a load vs strain increase with upward curvature that is also found in previous distraction studies of the mechanical properties of skin *in vivo* [5-9]. A mechanical dissipation with a stress softening effect is observed, apparently similar to the so-called Mullins effect classically described for filled elastomers [10-12]. Such behavior was successfully used to compare the mechanical properties of native skin and scars [5].

We observed that the softening effect was partly recovered at the second cycle, since the loading curve of the second cycle is clearly above the unloading curve of the first cycle. Such recovery is allowed during the time (close to 3 minutes) corresponding to the unload/load time during when the load was close to zero. This recovery effect is still in phenomenological correspondence with the Mullins effect recovery associated with the reorganization of the filler-polymer network. In

the case of skin tissue, the apparent Mullins effect is connected to the evolution with strain of the collagen network present in the dermis extracellular matrix. The softening effect is thus related to (i) the orientation of collagen fibrils and (ii) the redistribution of water in the extracellular matrix.

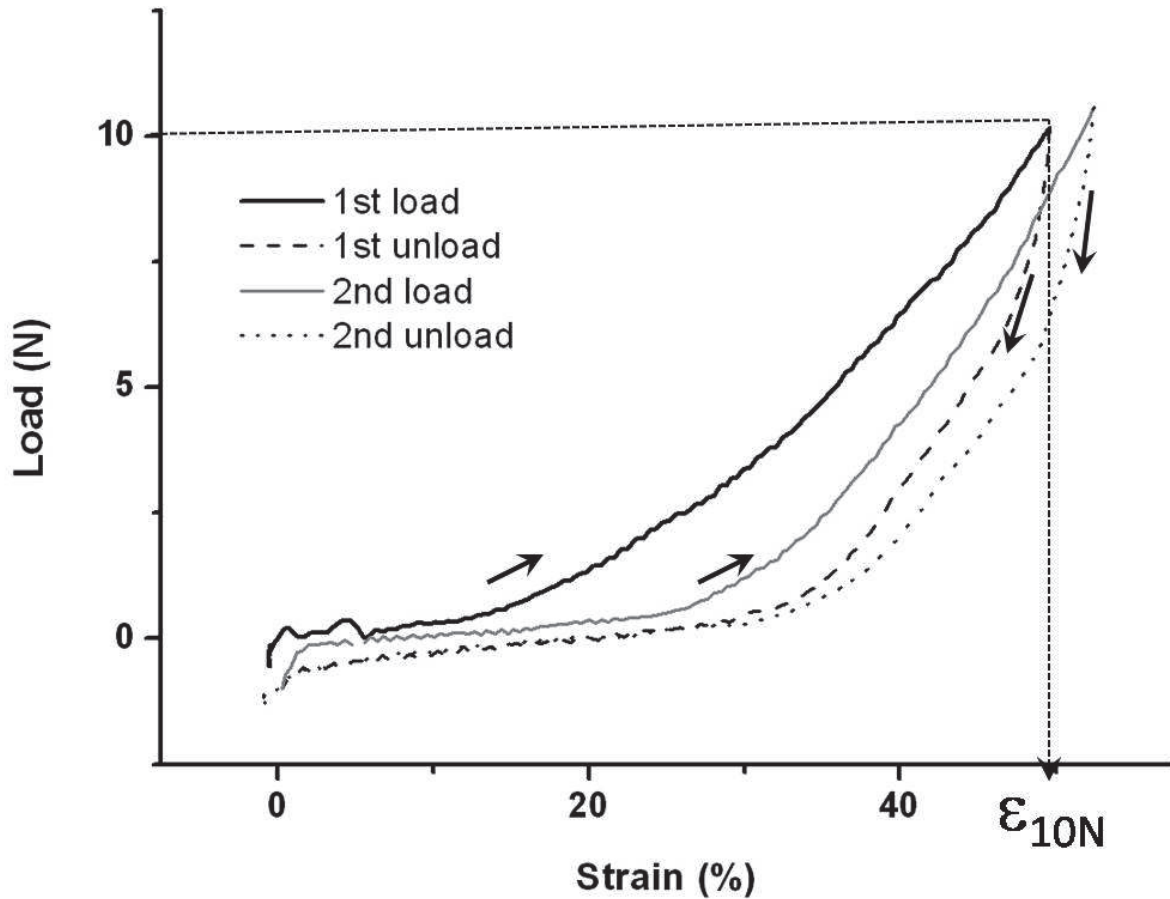


Fig. 9: In vivo tensile test performed on native skin. Hysteresis loops indicate a loss of mechanical properties after the first load, and a partial recovery phenomenon for the second load.

The results obtained with Tulle Gras® or BCPH can be compared with results obtained with native skin surrounding each wound. We observed in all case that the strain at maximal load ϵ_{10N} (as defined in figure 9) is lower for scar tissues than for native skin (fig. 10 and 11): the p-values of significance student tests are close to 0.064 and 0.041 for BCPH and TG respectively. Nevertheless BCPH scar tissues are significantly softer than Tulle Gras® as shown in fig. 11. A student test carried out on the difference values shows that the normalized BCPH strain values at 10N are significantly higher than the normalized strain values obtained for Tulle Gras® ($p=0.042$).

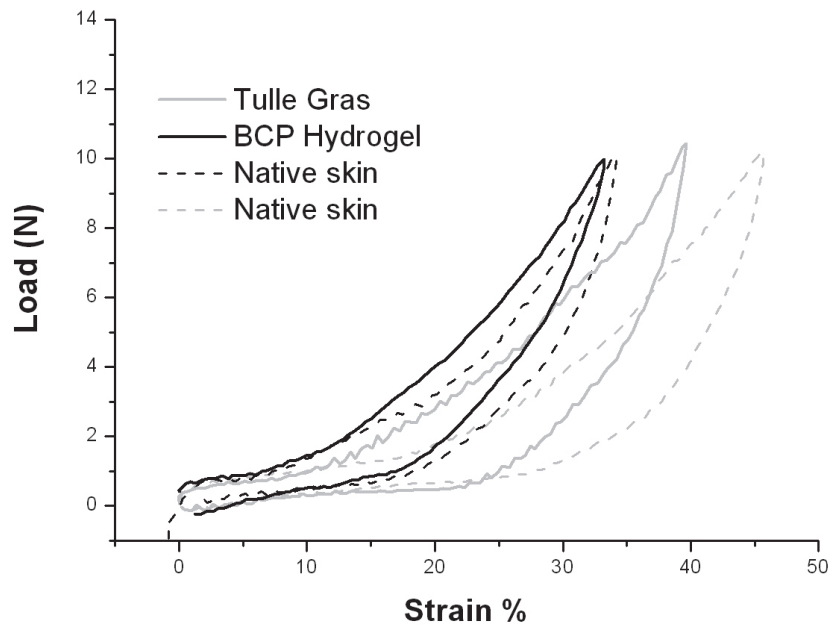


Fig. 10 : Example of comparisons of the first load/unload cycle performed on skin during in vivo tensile test, with the two different healing process. As a control, tensile test was performed in the native skin zone surrounding the regenerated skin tested.

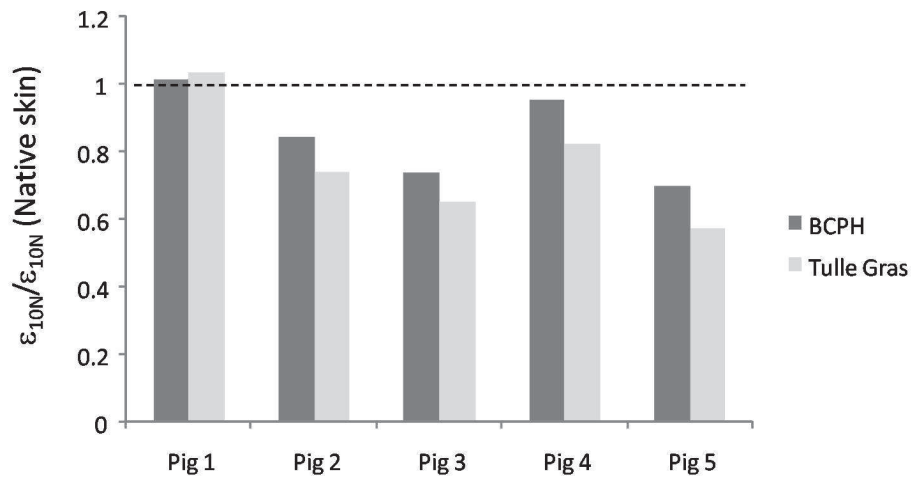


Fig. 11 : Scar/Native-skin 10 N average strain ratio

Ex vivo tensile tests

Stress-strain curves obtained during ex-vivo load/unload cycles are in accordance with those obtained during in vivo tensile tests. The Mullins effect was also clearly evidenced, with a mechanical dissipation loop, associated to the softening effect during the tensile test. For these ex vivo tests, results are displayed as average stress (defined as the ratio of the load on the cross-section of the epidermis + dermis samples) vs. nominal strain, for each load/unload cycling (fig. 12).

For all animals, native skin presented the softer stress/strain cycle trajectories, whereas the regenerated skin with Tulle Gras® healing dressing exhibited the highest stresses. Results obtained with BCPH-healed skin were closer to those obtained with native skin samples for load and unload stages.

Such behavior differences are probably due to a difference in the collagen network, Tulle Gras® yielding to a more rigid collagen network. It is not known if the density and the size of the collagen fibrils are indeed impacted by the regeneration conditions. In order to evidence such morphological evolution, histological analyses were used to determine in details the structure of native and reconstructed tissues.

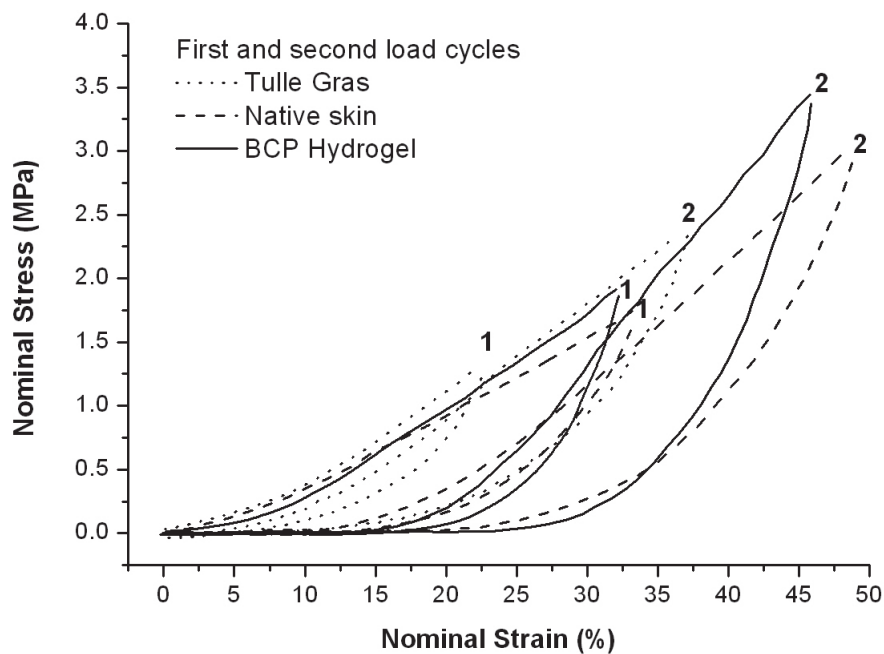


Fig. 12: stress/strain curves obtained during *ex vivo* tensile test, during two load/unload mechanical cycles at increasing applied stress.

3.4 Histology

3.4.1 General skin organization

Whatever the healing device used, after one year experiment HE staining revealed a complete reconstruction of tissues. As shown in fig. 13 there's no sign of any inflammation in the deep or superficial dermis, and epithelialization was complete. Collagen fibers bundles were in all cases of normal size, quantity and shape, and seemed well organized: there were thin bundles parallel

to dermo-epidermal junction in upper dermis and thicker bundles in deep dermis. Epidermis was in all studied samples of normal organization and thickness, and keratinocytes were of normal size, shape, and organization.

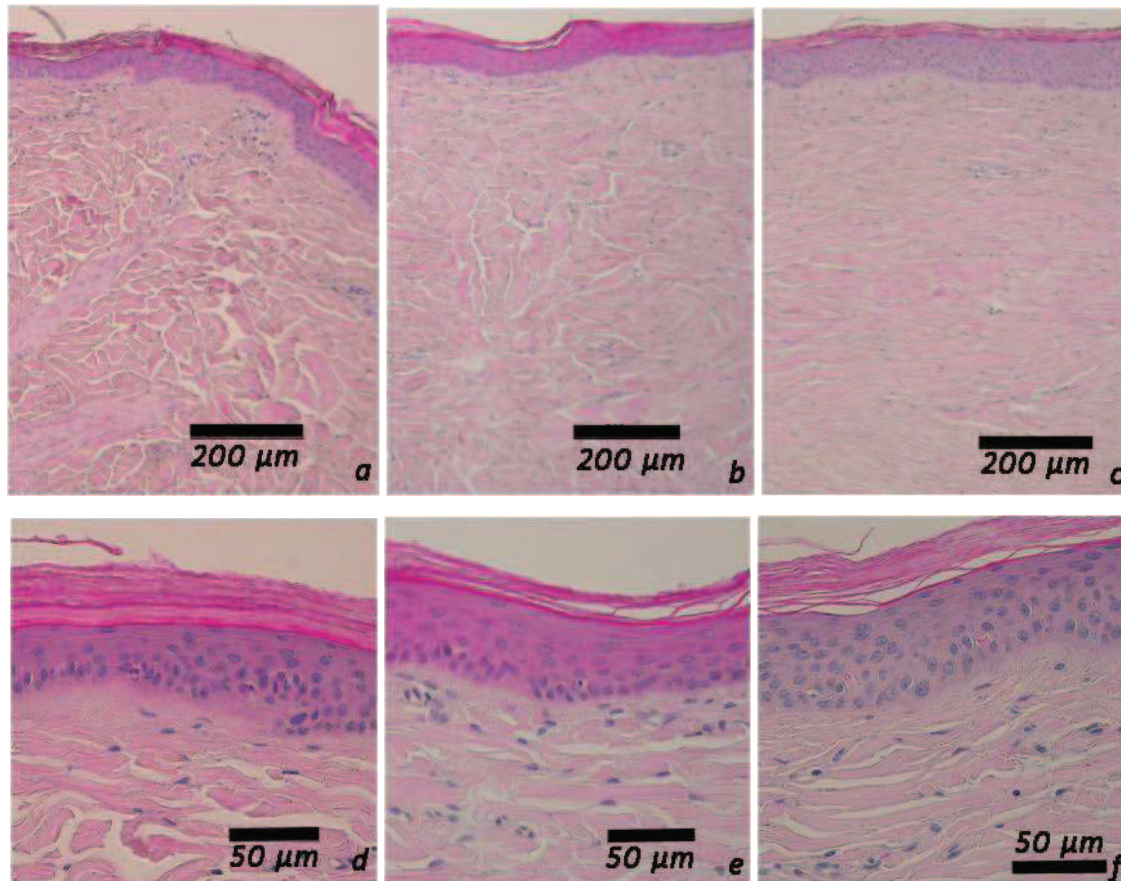


Fig. 13: HE staining of skin biopsy after one year experiment. a,d : normal skin ; b,e : chitosan hydrogel healing ; c, f :Tulle Gras® healing

3.4.2 Epidermis and dermo-epidermal junction

Immunohistochemistry revealed that for both healing devices, epidermis is quite similar to native skin epidermis, in term of general aspects and width. Cytokeratin AE1 AE3 staining (fig. 14) was identical in all cases, evidencing that keratinocytes synthesized the same kind of cytokeratins. All indicated that epidermal differentiation was normally going on. The assessment of cell proliferation in epidermis was performed by the detection of Ki67 antigen in the granular components of the nucleolus during late G1, S, G2 and M phases. Staining was limited to basal layer meaning no anarchic keratinocytes proliferation. It results that cell proliferation is comparable for native skin, and for both kinds of scars (fig. 15).

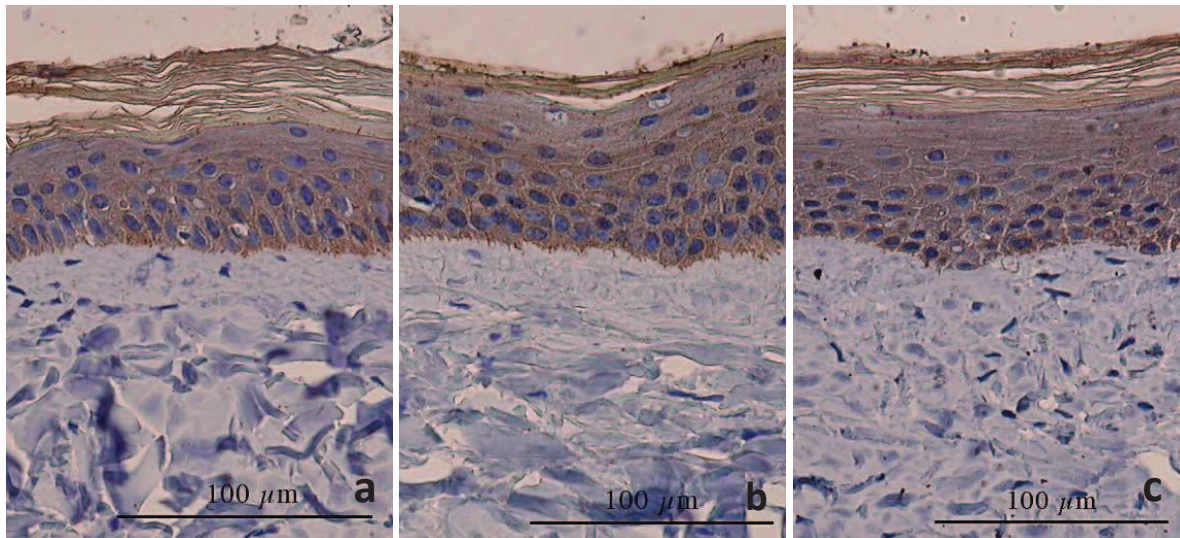


Fig. 14 : Cytokeratin AE1 AE3 staining. a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing

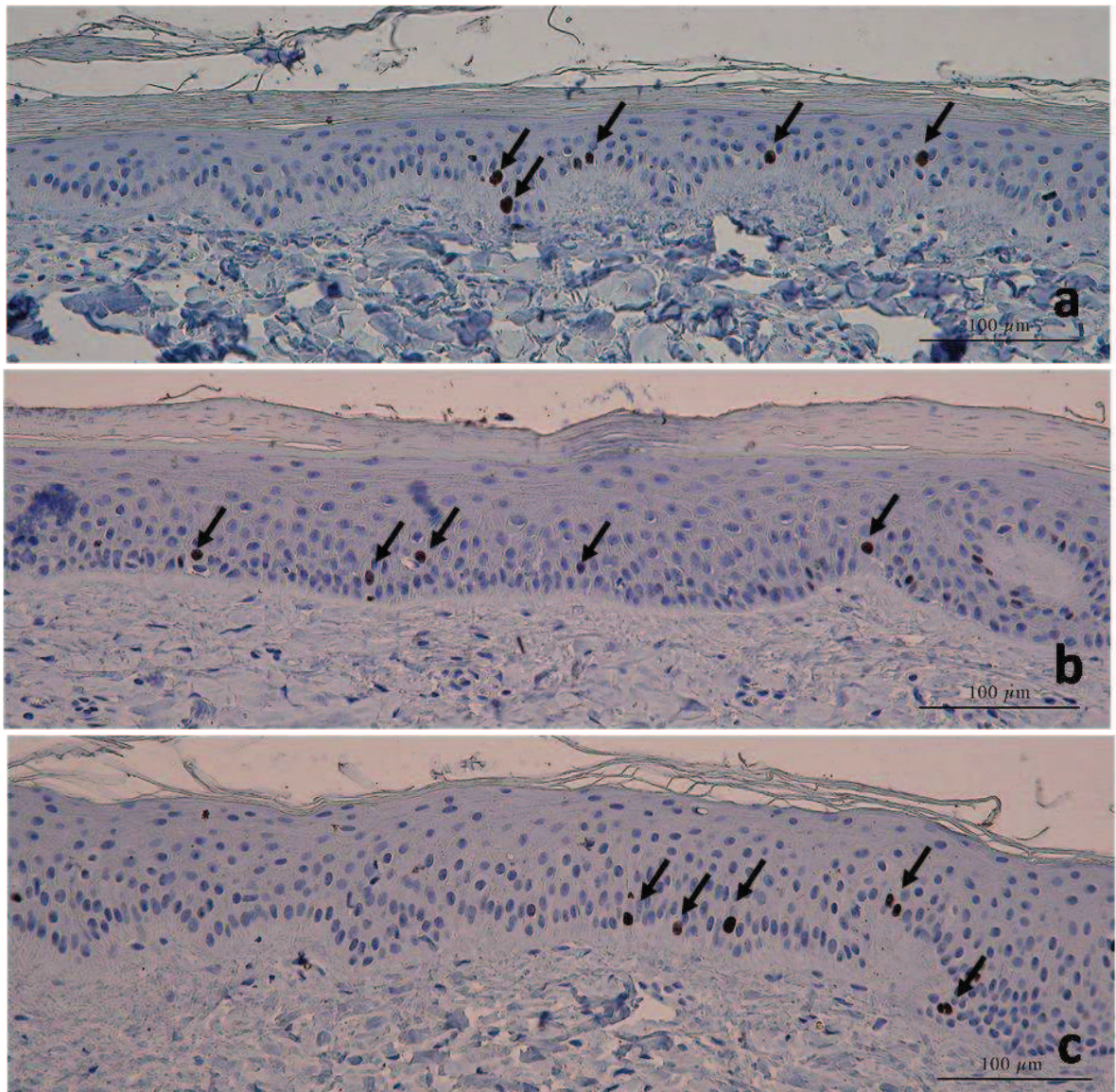
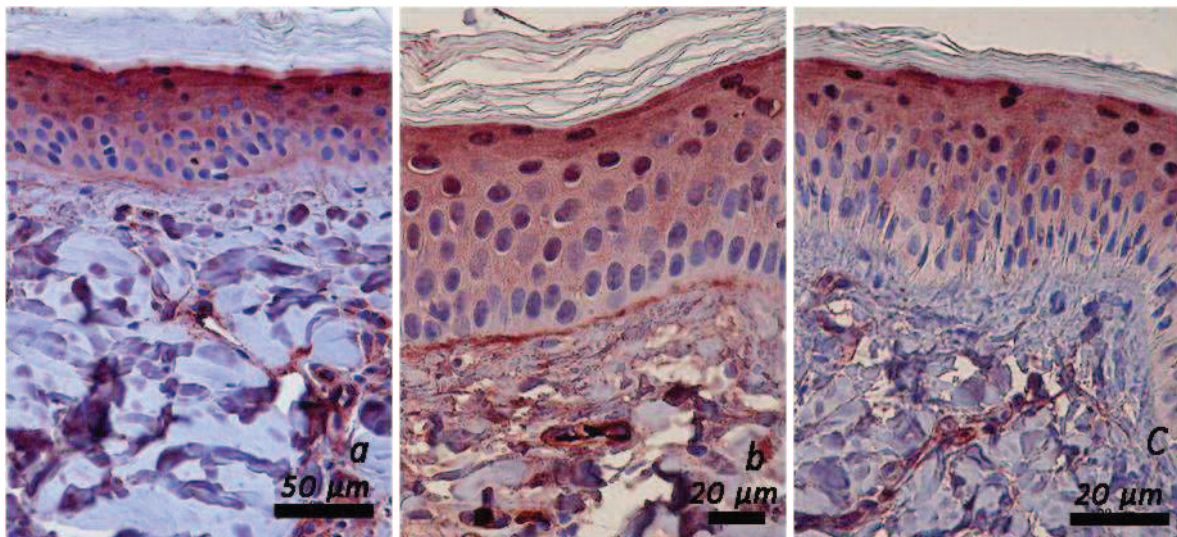


Fig. 15: Ki67 antigen. a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing. Arrows indicate identified dividing cells.

The quality of dermo-epidermal junction was assessed through collagen IV staining by specific antibody and PAS staining methods. Type-IV collagen is indeed a type of collagen found primarily in the basal lamina ; PAS staining is mainly used for staining structures containing a high proportion of carbohydrate macromolecules (glycogen, glycoprotein, proteoglycans), typically found in basal laminae. Collagen IV was clearly stained in the dermo-epidermal junction of native skin and skin healed with chitosan, but for some biopsies of scars obtained with Tulle Gras® healing method, a faint staining of collagen IV can be observed in dermo-epidermal junction, as shown in fig. 16. Nevertheless PAS staining method shows no difference between the three kinds of samples observed (fig. 17). We concluded that epidermal basal laminae were quite similar in scars and in native skin.



*Fig. 16 : coll IV antibody staining.
a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras®.*

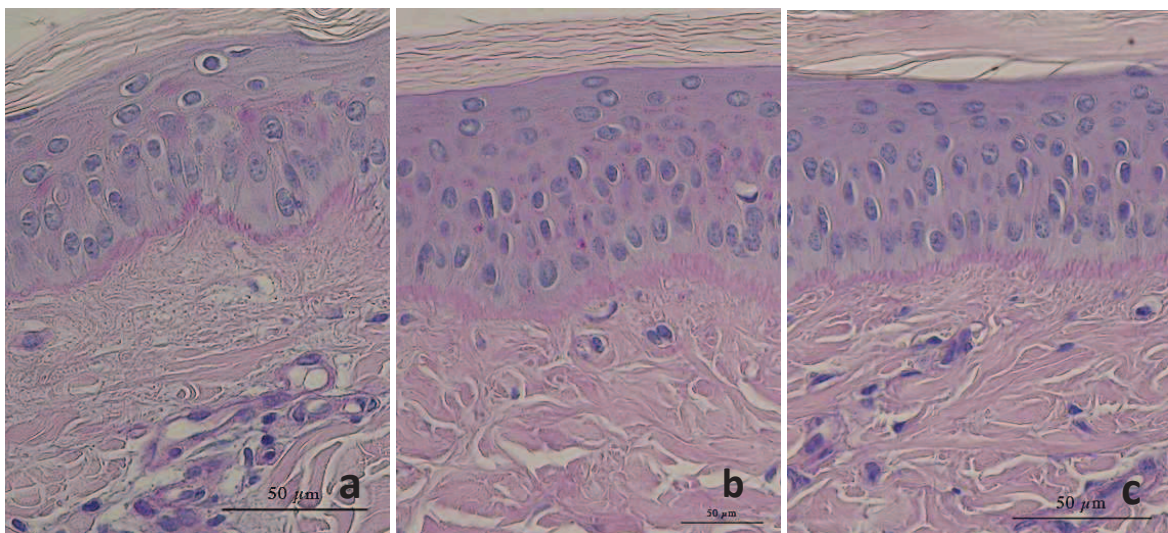
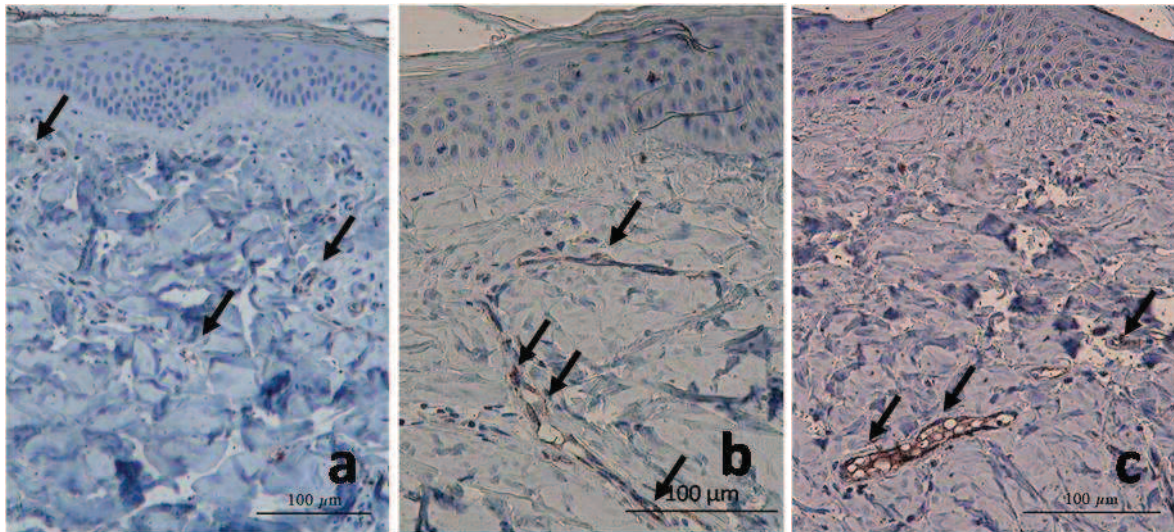


Fig. 17 : PAS staining. a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing

3.4.3 Vascularization

Skin vascularization was assessed thanks to endothelial cells staining by the use of Factor VIII antibody since Factor VIII related antigen is present in endothelial cells [13]. Angiogenesis is a normal and vital process in growth and development, as well as in wound healing. Immunohistochemistry showed endothelial cells of normal size, shape and organization, forming blood vessels in upper and deep dermis, in both kinds of scars (fig. 18).



*Fig. 18: Evidence of endothelial cells thanks to Factor VIII antibody.
a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing*

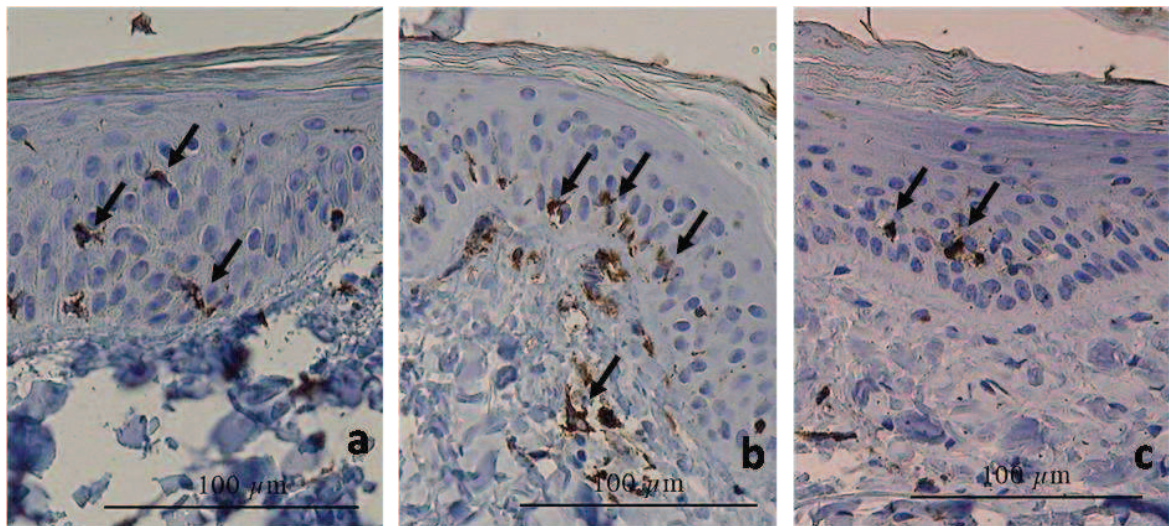
3.4.4 Skin immuno-efficiency

The B Lymphocyte Antigen with a molecular weight of 36 kD (BLA36) is a membrane associated glycoprotein expressed on early progenitor B cells and B cells. In pig skin, BLA36 antibody also highlights epidermal and dermal dendritic cells, as shown in fig. 19. Epidermal dendritic cells (Langerhans cells) are immune cells whose main function is to process antigen material and present it on the surface to other cells of the immune system, thus functioning as antigen-presenting cells. They act as messengers between the innate and adaptive immunity. Once activated, they migrate to the lymphoid node where they interact with T cells and B cells to initiate and shape the adaptive immune response.

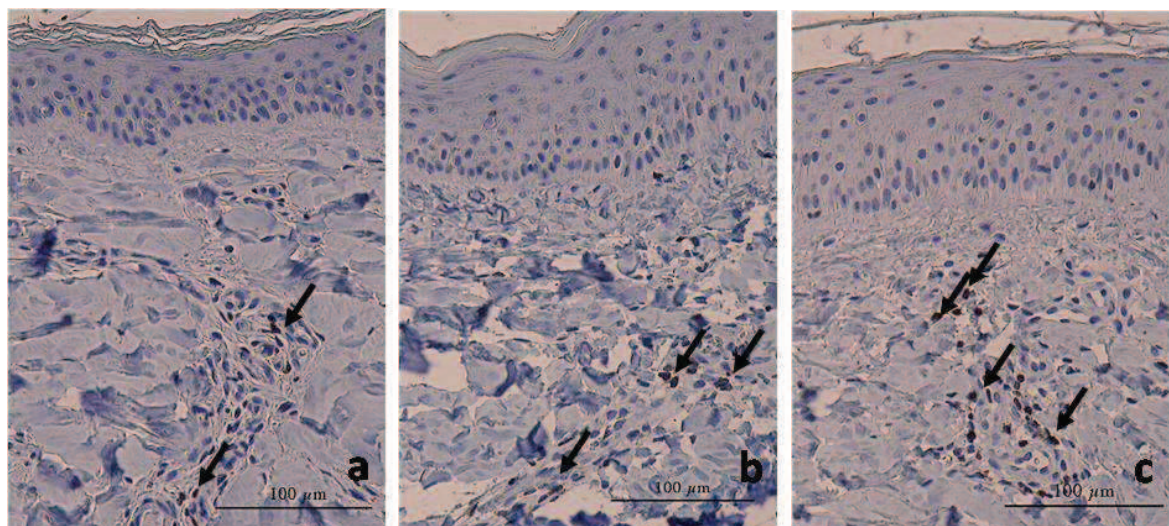
T cells are highlighted in fig. 20 thanks to CD3 antibody. Some T cells are visible in normal proportions surrounding blood vessels, in all cases.

HM57 antibodies revealed no visible macrophage in native or regenerated skin (fig. 21)

The use of Bla36, CD3 and HM57 antibodies leads us consider that after one year there's no remaining inflammation in regenerated skin since no macrophage cells can be observed and T cells are in normal proportions around blood vessels. Regenerated skin can also be considered as immuno-efficient, since Langherans cells can be observed in epidermis.



*Fig. 19: Evidence of dendritic cells thanks to Bla36 antibody.
a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing*



*Fig. 20: T cells staining thanks to CD3 antigen.
a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing*

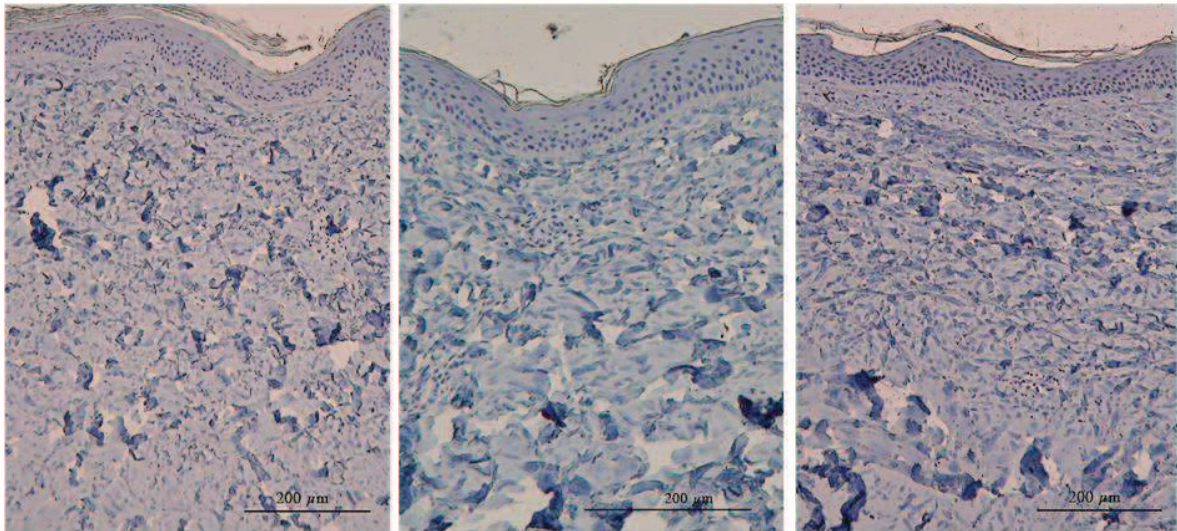


Fig. 21: HM57 antibody for macrophages evidence. a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing. No visible macrophage, in any biopsy.

3.4.5 Skin innervation

Endly, we used a standard immune-histochemical assay with an antibody against S-100 protein as a means of identification of nerves. It showed that nerves are rebuilt in upper and deep dermis whatever the device used (fig. 22).

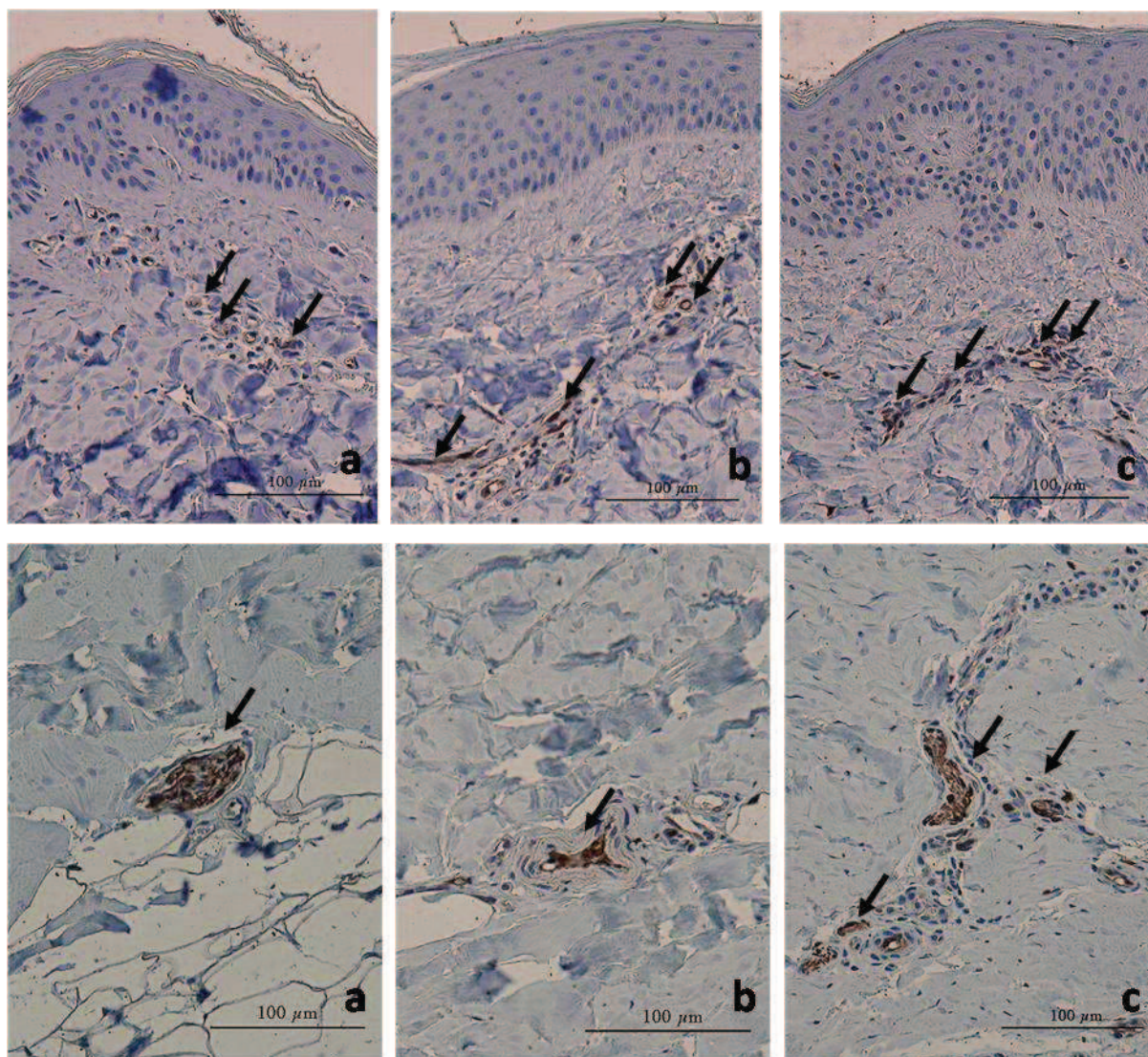


Fig. 22: S100 protein antibody. a: normal skin; b: chitosan hydrogel healing; c: Tulle Gras® healing

3.4.6 Histological study of BCPH

Histochemical observations were also performed on chitosan hydrogels used for wound healing. They were dehydrated and embedded in paraffin, sectioned, and stained with HE for optical microscopy observation. Results showed in fig. 23a&b attest of an important cellular colonization of hydrogels devices. Some laminar structures seemed to be formed in the vicinity of hydrogel internal cracks, and close to the surface of the external gel. In these areas of hydrogels, cells were in contact with air. AE1 AE3 antibody staining revealed that these laminar structures are made of cytokeratins (fig. 23c&d), organized quite like *Stratum Corneum*.

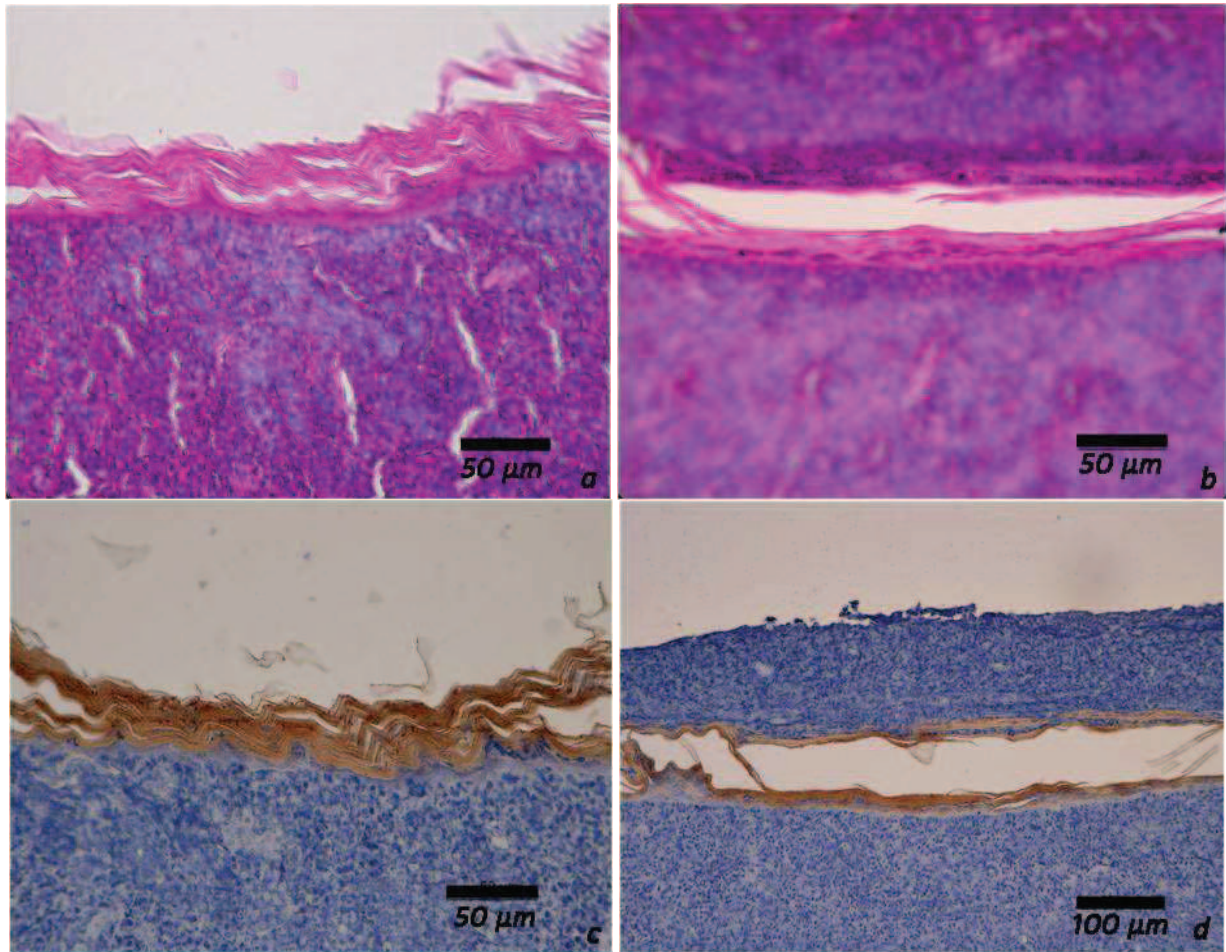


Fig. 23 : Histological observation of implanted hydrogel removed from the wound after 20days of healing. a,b: HE staining; c,d: cytokeratin AE1 AE3 staining.

4. Discussion

Preparation of hydrogels.

In this work, BCPH were prepared in a laminar flow hood with sterile chitosan flakes and sterile equipments instead of a final sterilization step, in order to preserve final mechanical properties of the devices. Boucard et al. studied the influence of autoclaving sterilization conditions [1] and showed that the decrease of molecular weight of chitosan after high-temperature steam sterilization treatment is lower in solid form than in liquid or gel forms. To our knowledge, there was no previous study evidencing the potential impact of autoclaving on the biological properties of physical chitosan hydrogels.

In addition, during BCPH preparation, the second layer adhesion on the first one is due to a partial re-dissolution of the first layer surface by the acidic chitosan chlorhydrate solution poured to form the second layer. This favoured chains diffusion between the two layers and led to the formation of a glue joint at the interface that did not allow to separate the gels without beaking the hydrogel layers themselves. The external layer, obtained by the hydroalcoholic route, provides higher mechanical properties and water supply for the whole healing device, whereas the internal layer, softer, constituted the bioactive interface directly in contact with the wound. Rivas et al. [4] showed that the gelation route largely impacts the morphology of hydrogels through the effect of the solution viscosity. In the alcoholic gelation route, the progressive evaporation of water leads to the formation of an alco-gel that will dissolve in presence of water. Neutralization stabilization of such gels leads to a quasi isotropic organization whereas neutralization of solutions of chitosan leads to an anisotropic morphology, eventually with micron-range capillary tubes. This phenomenon is explained by the lower viscosity of chitosan solution which allows the formation of periodic streamlines at the sol-gel interphase whereas these periodic streamlines do not occur when neutralizing alco-gel because the transition layer is highly viscous. From this difference in micro-structural organization, we may expect different biological behavior for each kind of hydrogels.

Skin regeneration.

The main advantage presented by BCPH devices is that they did not have to be replaced every two days contrary to the control healing device Tulle Gras®. This prevents pain and risks of infection and daily care duration, in civilian or military contexts, is also significantly reduced. Wound contraction is about 40% with BCPH and Tulle Gras® and can be explained by the important skin deficiency due to the extended initial tissue resection. It is important to notice that animals' youthfulness favor a rapid healing and so has a potential effect on wound contraction.

Mechanical properties of regenerated skin were qualitatively similar to those of native skin, especially with BCPH. Load-extension curves display a first regime (below 15%) during which a extension can be operated at low load or stress values. In the second regime at higher deformations stiffening occurs with absence of linearity and an upward concavity in the load/stress vs deformation curves. The first regime can be related to the extension of the elastin

network, whereas the second regime is associated with the deformation of the collagen network. Mechanical hysteresis phenomena observed *in* and *ex vivo* suggest a strain-induced softening effect; nevertheless a partial recovery occurs between the first unloading curve and the second load curve as it is classically described in the description of Mullins effect in filled elastomers. Such dissipative and recovery phenomena can be explained by collagen network/water rearrangement during the mechanical test [14]. Thus we can conclude that a part of the structural rearrangement of the hydrated collagen network is reversible within short times, for all healed wound and native skin. On application of macroscopic deformation, a partial local dehydration/rehydration is likely to occur with applied hydrostatic pressure, as it is observed classically with other hydrogels. An other source of mechanical dissipation and recovery is the structural evolution of the collagen fibrils with strain-induced reorientation. Nevertheless, a significant component of deformation (fibril breakage, inter-fibrillar slippage) will not recover within the experiment time, in the strain range investigated here. Additional experiments, with longer recovery times have to be performed to quantify the recovery kinetics and the proportion of recoverable mechanical properties.

On a quantitative approach, scars exhibited a higher stiffness than native skin, especially Tulle Gras® is significantly stiffer. The BCPH scars exhibit an intermediate modulus or stiffness between native skin and Tulle Gras® scar. Of course, it suggests a different elastin content and/or a different fiber arrangement in collagen structure. Histological study of native and scar tissues (in the length scale above the micron up to macroscopic sizes) did not evidence a difference in the dermis collagen network structure. It revealed that regenerated skin organization is generally the same as native skin, in terms of cellular content, innervation and vascularization. Neo-tissues can also be considered as functional since they are able to insure its barrier properties, especially in terms of immune efficiency, although hair follicles and glands were not reconstructed.

Massive cellular colonization of dried BCPH indicates an important affinity of cells for the device and suggests that it could be used as a support for skin graft culture for example. Presence of cytokeratins in the hydrogels means that keratinocytes are able to differentiate in BCPH as they do in a natural epidermis. Further investigations are required to understand biological mechanisms responsible of this cellular colonization and its kinetics [*Cf chapitre suivant*].

Similar bilayered chitosan hydrogel devices were prepared previously and analyzed in a similar context [1]. Nevertheless, the hydrogel-tissue interactions were described with profound

differences, invoking a complete absence of cells in the hydrogels, even 20 days after implantation. This scenario would imply that the hydrogels are only supports for tissue reconstruction. This scenario is in complete disagreement with the results reported here (compare figure 22 in this work and figure 3 in Boucard, 2007 [1]) with the colonization of hydrogels and a proper differentiation of cells in both hydrogel layers. Thus, the hydrogels appear as remarkably chemiotactic scaffolds.

In conclusion, BCPH assemblies can be considered as a promising alternative to existing healing devices, since they lead to a functional regenerated skin with mechanical properties close to native skin, without usual painful dressings replacements. BCPH are easy to handle and safe since they contain only chitosan and water, moreover the intrinsic antibacterial and antifungal properties of chitosan hydrogels [*Cf chapitre suivant*] are of great interest for burn healing applications. The present study showed an important cell affinity for chitosan hydrogels which is clearly encouraging for their use as scaffolds in the field of tissue engineering. Kinetics of cellular colonization and biological exchanges between chitosan hydrogels and host tissue have to be further studied for a better understanding of bioactive properties of BCPH, their interaction with cells and their future improvements [*Cf chapitre suivant*].

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the French armament procurement agency “Délégation Générale pour l’Armement” (DGA).

5. References

- [1] N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard, The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns, *Biomaterials*, 28 (2007) 3478-3488.
- [2] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomaterials*, 26 (2005) 933-943.
- [3] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 653-662.

- [4] R. Rivas-Araiza, P. Alcouffe, C. Rochas, A. Montembault, and L. David, Micron Range Morphology of Physical Chitosan Hydrogels, *Langmuir*, 26 (2010) 17495-17504.
- [5] K. H. Lim, C. M. Chew, P. C. Chen, S. Jeyapalina, H. N. Ho, J. K. Rappel, and B. H. Lim, New extensometer to measure in vivo uniaxial mechanical properties of human skin, *J Biomech.*, 41 (2008) 931-936.
- [6] J. A. Clark, J. C. Cheng, and K. S. Leung, Mechanical properties of normal skin and hypertrophic scars, *Burns*, 22 (1996) 443-446.
- [7] M. D. Ridge and V. Wright, Mechanical properties of skin: a bioengineering study of skin structure, *J Appl. Physiol*, 21 (1966) 1602-1606.
- [8] M. D. Ridge and V. Wright, The directional effects of skin. A bio-engineering study of skin with particular reference to Langer's lines, *J Invest Dermatol*, 46 (1966) 341-346.
- [9] D. L. Bader and P. Bowker, Mechanical characteristics of skin and underlying tissues in vivo, *Biomaterials*, 4 (1983) 305-308.
- [10] L. Mullins and N. R. Tobin, Stress Softening in Rubber Vulcanizates .I. Use of A Strain Amplification Factor to Describe Elastic Behavior of Filler-Reinforced Vulcanized Rubber, *Journal of Applied Polymer Science*, 9 (1965) 2993-&.
- [11] I. Stevenson, L. David, C. Gauthier, L. Arambourg, J. Davenas, and G. Vigier, Influence of SiO₂ fillers on the irradiation ageing of silicone rubbers, *Polymer*, 42 (2001) 9287-9292.
- [12] L. Yan, D. A. Dillard, R. L. West, L. D. Lower, and G. V. Gordon, Mullins Effect Recovery of a Nanoparticle-Filled Polymer, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 48 (2010) 2207-2214.
- [13] E. A. Jaffe, D. Deykin, E. Salzman, and L. Schnipper, Endothelial Cells and Biology of Factor-Viii, *New England Journal of Medicine*, 296 (1977) 377-383.
- [14] H. L. Stark, Directional variations in the extensibility of human skin, *Br. J Plast Surg*, 30 (1977) 105-114.

3^{ème} partie : Scénario de la cicatrisation cutanée en présence d'hydrogels physiques de chitosane

Les résultats obtenus au cours de l'expérimentation E1 amènent plusieurs interrogations, en particuliers quant aux types d'interactions entre le chitosane et le milieu biologique. Il semblerait en effet, si l'on considère l'étude histologique des hydrogels implantés, qu'il existe un mécanisme de dégradation des gels favorable à la construction du tissu vivant. Les hydrogels sont donc colonisés par les cellules au cours de la cicatrisation, et nous avons voulu savoir qu'elle était la cinétique de cette colonisation et quels étaient les acteurs cellulaires concernés afin d'établir un « scénario » de la cicatrisation en présence d'hydrogels physiques bicouches de chitosane. Par ailleurs, les résultats obtenus par Boucard et al. n'indiquaient aucune colonisation cellulaire des dispositifs, aussi nous nous sommes intéressés à l'origine de cette différence entre les deux études et avons décidé d'étudier de plus près les hydrogels après implantation. En particulier nous avons choisi d'étudier l'influence probable de la morphologie de l'hydrogel - liée à sa fabrication par voie aqueuse ou hydroalcoolique – sur la colonisation cellulaire.

C'est dans cette perspective qu'a été menée l'expérimentation E3 pendant 35 jours, chez deux porcs charcutiers. L'ensemble du protocole expérimental a été décrit dans le chapitre précédent et les résultats feront prochainement l'objet d'une publication, retranscrite ici dans une mise en page similaire au reste du manuscrit.

Multilayered Physical hydrogels of chitosan for skin regeneration. Short term evaluation of cellular colonization after deep surgical wound.

F. Dupasquier¹, L. David¹, Claude Carozzo², D. Pin², D. Agay³ and Y. Chancerelle³

¹ Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP) UMR CNRS 5223, Laboratoire IMP@Lyon1, Bât. EPU Lyon 1, 15, bd Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex France.

² RTI2B, Department of Surgery VetAgro-Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile.

³ Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, 24 Av. du Maquis du Grésivaudan, BP87, 38702 La Tronche Cedex, France.

1 Introduction

The interest of hydrogels in the field of tissue engineering has been evidenced for many years. Chitosan-based hydrogels have several advantages compared with synthetic materials, especially in terms of absence of toxicity and moderate inflammatory reaction. The bioactive properties of chitosan physical hydrogels have been studied in several studies [1-3], but the underlying biological mechanisms remains largely speculative. In several studies, the devices were described to be not colonized by surrounding cells [1-3], whether the experiment was carried *in* or *ex vivo*. Chitosan physical hydrogels are indeed indicated for wound healing and tissue repair for different tissues (cartilage, peritoneous membrane, skin...). Several authors showed the effectiveness of such hydrogel devices for skin regeneration after deep burns in pigs and rat models [3,4] and underlined the clinical interest of these dressings, since they don't need to be replaced during the whole healing period, although a complementary dressing is necessary to avoid the drying of the hydrogels. Boucard et al. performed histological analyses on implanted devices used during the experiment carried in pigs and observed no cellular colonization of the materials after 21 days [3]. However, in a more recent wound healing study, the same devices appeared to be colonized by a large amount of cells on the same model. Cytokeratins were also observed in the bulk of hydrogels and at the surface of cracks, meaning keratinocytes infiltration and

differentiation. These new observations required further experiments to understand cellular colonization mechanism and its kinetics. The present study was designed for this purpose and consists of histological analyses for cellular content evaluation of implanted bi-layered chitosan hydrogels at different healing times.

2 Materials and methods

2.1 Chitosan hydrogels preparation

Purification of chitosan

We used chitosan flakes from squid pens purchased from Mahtani Chitosan (batch n° 113). In order to purify the polymer, flakes were dissolved at 0.5 % (w/w) with an amount of acetic acid necessary to achieve the stoichiometric protonation of the $-NH_2$ sites. The solution obtained was filtered on 3, 1.2 and 0.45 μm Millipore membranes. The polymer was then fully precipitated by the addition of ammonium hydroxide (28 % (w/w)). After several washings in deionized water and centrifugation steps until a neutral pH was achieved, chitosan was lyophilized. The obtained lyophilizate was a chitosan of low DA (about 1.5 %), high molecular weight (M_w close to 500 000 g/mol) determined by size exclusion chromatography (SEC). SEC was performed by means of an IsoChrom LC pump (Spectra-Physics) connected to a Protein Pack glass 200 SW column and a TSK gel 6000 PW. A Waters 410 differential refractometer and a multiangle laser-light scattering detector operating at 632.8 nm (Wyatt Dawn EOS) were connected on line. A 0.15 M ammonium acetate / 0.2 M acetic acid buffer (pH 4.5) was used as eluent. Chitosan was dissolved in the buffer (1 mg/mL), filtered on 4.5 μm Millipore membrane and then injected (100 μL). In our case, the refractive index increment dn/dc was evaluated at 632 nm and found equal to 0.196 cm^3/g [5].

The water content in the initial chitosan flakes was close to 10% w/w as determined by thermogravimetric analysis (DuPont Instrument 2950). About 10 mg of chitosan was analysed under a helium flow, operating at a ramp of temperature of 2 $^{\circ}C/min$, from 30 to 50 $^{\circ}C$.

Preparation of bi-layered hydrogels

Freeze-dried purified chitosan lyophilisates in the free amine form were sterilized in the solid state by a 20 minutes autoclaving stage at 121°C (Matachana table-top steam sterilizer), in accordance with Boucard *et al.* [3]. In addition, all tools, accessories and containers were also previously sterilized with high-temperature water steam. Chitosan chlorhydrate solutions at a concentration of 3% (w/w) were prepared in a laminar flow hood with sterilized deionised water and a stoichiometric amount of hydrochloric acid (37% in water) necessary to achieve the protonation of all $-NH_2$ sites. The complete dissolution of polymer was obtained after about 8 hours of mechanical stirring.

Bi-layered physical hydrogels were then prepared in sterile conditions as described by fig.1: a first layer of hydrogel was obtained from an initial hydroalcoholic mixture of chitosan chlorhydrate solution (3% w/w) and 1,2-propanediol in a 1/1 ratio. After the complete evaporation of water (thus corresponding approximately to a half-weight loss) obtained after a drying thermal treatment in an oven at 50°C, we obtained an alcogel [6]. Then a layer of aqueous solution of chitosan chlorhydrate (3% w/w) was poured on the previous alcogel. Finally the whole system was placed during about two hours in gaseous ammonia vapors which diffuse both through the gel and the solution. This step led to the gelation of both the solution and alcogel layers as previously described [3,7], by the neutralization of protonated amine functions. The adhesion between layers was due to a partial re-dissolution of the alcogel layer surface by the acidic chitosan chlorhydrate solution poured to form the second layer. This favoured chain interdiffusion between the two layers and led to the formation of a "glue" joint at the interface.

Several washings in sterilized deionised water ensured the elimination of 1,2 propanediol from the alcogel layer on the one hand, ammonium chloride and excess of ammonia from both layers on the other hand.

The final wound healing device (fig. 2) is composed of two 4 mm thick layers containing only chitosan (neutralized form, with concentration close to 3% w/w) and water. The layer obtained by the hydroalcoholic way provides higher mechanical properties and water supply for the whole multilayer system whereas the second layer, softer, is in close contact with the wound. Final devices were kept in sterile deionised water until their use.

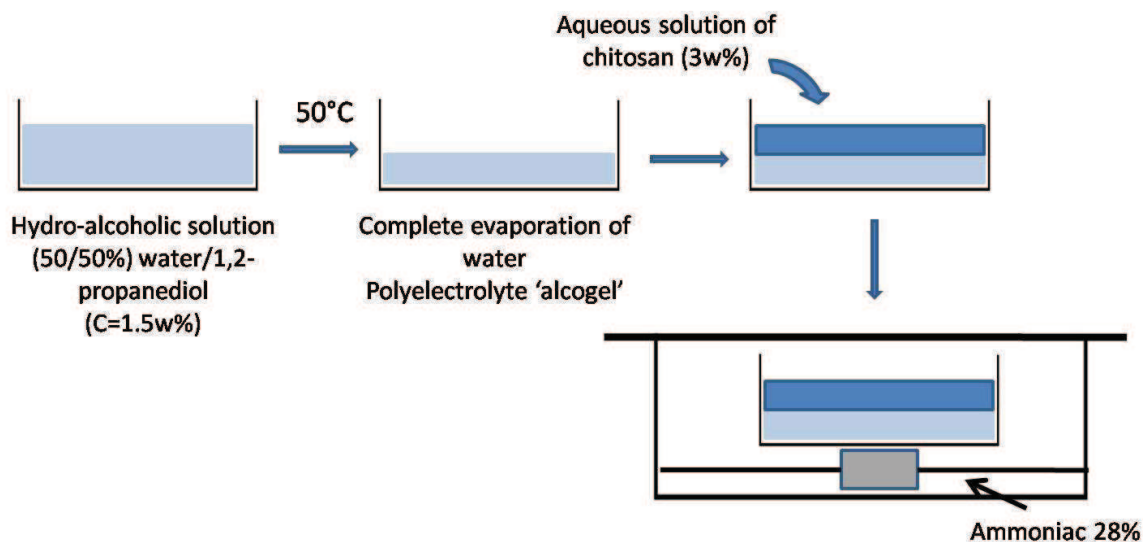


Fig. 1: Processing of bilayered chitosan hydrogel

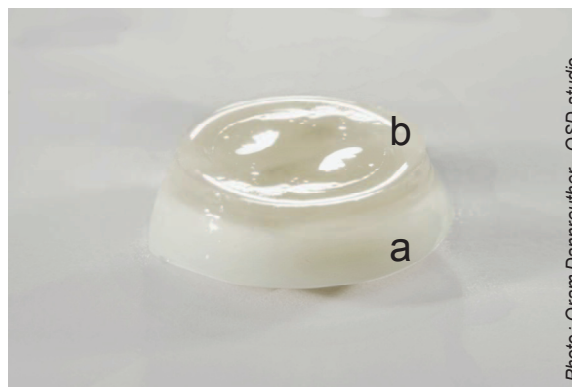


Fig.2: Bilayered chitosan physical hydrogel. (a) soft hydrogel layer obtained by aqueous gelation route (wound side) ; (b) Rigid hydrogel layer obtained by hydroalcoholic gelation route (upper side).

2.2 In vivo experiment

Animal care

In order to study the bioresorption and the wound healing mechanism in presence of bilayered chitosan physical hydrogels (BCPH), the experiment was performed in an *in vivo* pig model. In accordance with ethical guidelines established by the National Institute of Health, the procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the National Veterinary School of Lyon. Two female Landrace pigs weighing about 20 kg were purchased from. They were quarantined for 2 weeks before the experiment and daily handled during this adaptation period to allow further stress minimization. Animals were housed in small

individual boxes in accordance with the legislative standards prescribed by French Ministry of Agriculture and Environment.

Study design

The aim of this study was to get a better understanding of biological phenomena involved in wound healing in presence of BCPH. Premedication with Vetranquil (0.1 ml/kg) was administered to the pigs twenty minutes before an intra-muscular injection of Imalgene-Rompun® (10mg/kg ketamine + 2mg/kg xylazine). Anesthesia was maintained by a gaseous procedure (Isoflurane 2.5% on 100% O₂). Under deep anesthesia, ten circular chirurgial wounds of 3 cm diameter were punched on the back of each animal symmetrically to the sagittal plane. All dermis, epidermis and hypodermis were removed. Hemostasis was achieved with sterile compresses before implantation.

To avoid any pain, analgesia was provided by an immediate post-surgical injection of 10 mg of morphine (Morphine Aguettant®) and by a patch releasing 50µg/h of Fentanyl (Durogesic®), replaced every 3 days.

All wounds were filled with chitosan bi-layered hydrogels (Fig. 3). The soft layer processed from the neutralization of the solution was placed internally and the harder gel processed from the alcogel route in the external orientation. A complementary dressing composed of a polyurethane micro-porous film (Tegaderm®), sterile compresses and Elastoplast® was used to protect and keep implanted devices in position.

The multilayered gels were never replaced during the experiment but removed one by one at different healing times (day 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28 and 31) for histological studies whereas Tegaderm® films, sterile compresses and Elastoplast® bandages were replaced every two days.

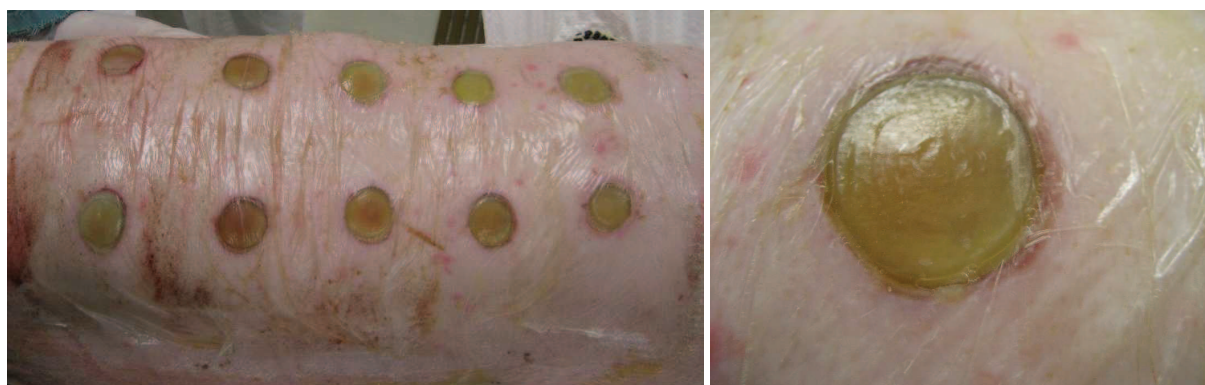


Fig.3: implanted bilayered chitosan physical hydrogels covered with Tegaderm® film.

For histological analyses, gels sample were fixed in 10 % phosphate buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned with a microtome (thickness of 5 μm), and stained with Hemalun-Eosin (HE) for optical microscopy evaluation.

3. Results

Histological analysis 2 days after hydrogels implantation showed infiltrated inflammatory cells in hydrogels cracks (fig. 4a), which were polymorphonuclear cells (PMN), mainly eosinophilic PMN. In the surrounding of these cells, tinctorial properties of hydrogel are changed (fig. 4b) with darker zones after HES coloration, which may indicate changes in polymer structure or hydrogel enrichment by components of the extracellular matrix. In the colonized parts of the gels, fibrillar structures can be observed in the cracks that are formed in the bulk hydrogel (Fig. 4c). The use of AE1-AE3 specific antibody stainer showed that these fibrillar structures were actually keratin (Fig. 4d). The presence of keratin is an indication that keratinocytes are already present within the colonized zones of the hydrogels even at very early stages of implantation. It is not known if such keratinocytes have effectively invaded the accessible regions of hydrogels from the surrounding tissues or if they originated from more pluripotent cells and differentiated locally in presence of the hydrogel matrix.

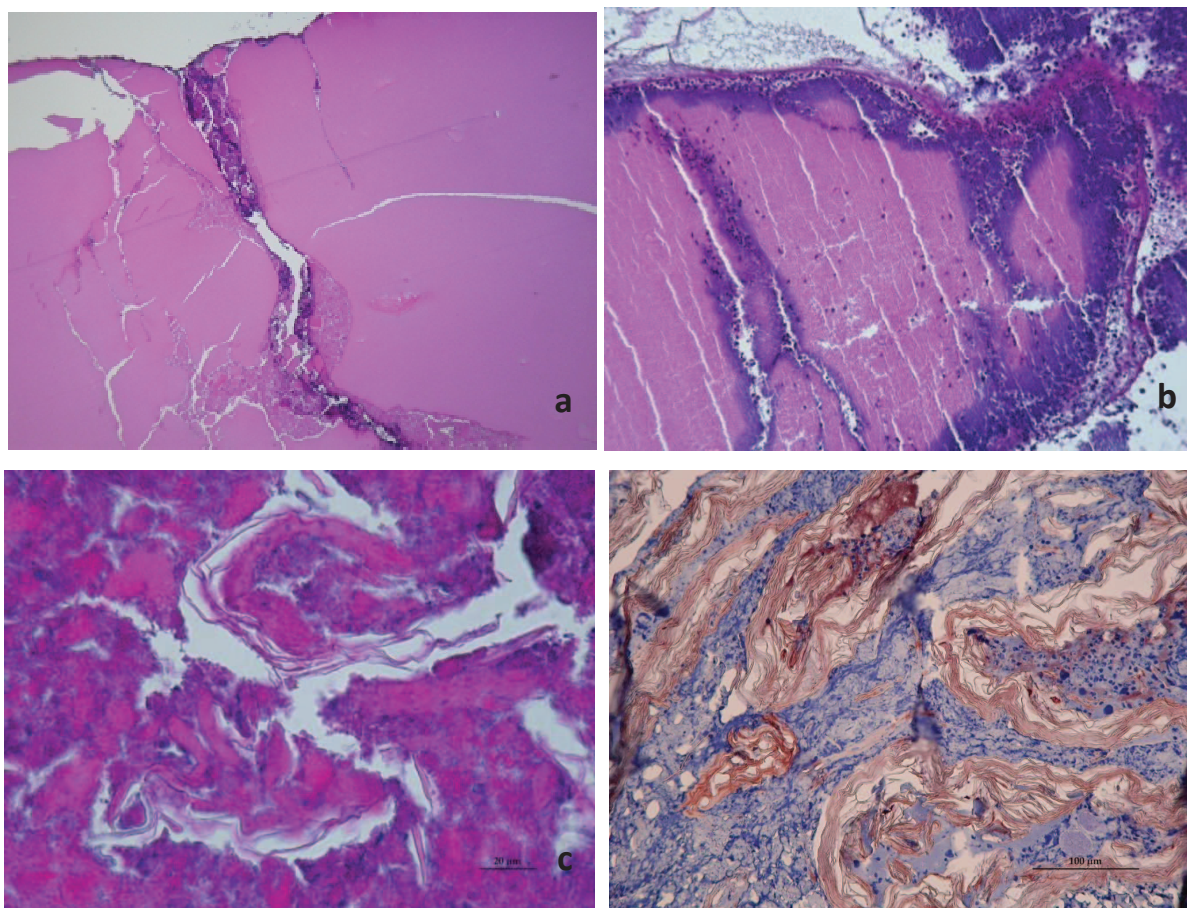


Fig. 4: HE staining of BCPH removed after 2 days of wound healing. (a) Infiltration of inflammatory cells in hydrogels splits; (b) Front of cell colonization and resulting BCPH tinctorial properties modification; (c) Formation of fibrillar structures in the surrounding of invaded hydrogel zones; (d) Identification of the fibrillar structure with cytokeratin AE1 AE3 specific antibody (brown).

Following the first infiltration of PMN, histological analysis showed other kind of inflammatory cells 4 days after hydrogels implantation namely macrophages, lymphocytes, plasmocytes, and mesenchymal cells. Fibroblasts were also observed, even if no collagen fibers could be evidenced. Part of the hydrogel bulk was almost completely colonized by cells, and only some fragments were remaining, surrounded by numerous macrophages and giant polynuclear cells (fig. 5a). Remaining gel particles were gradually fragmented, infiltrated by cells and phagocyted (the phagocyte cell circled in fig. 5b is full of hydrogel). Hydrogels were colonized by erythrocytes (fig. 5c), serum, fibrin, etc. because of blood and exudates infiltration, and thus became favorable medium for extracellular matrix formation and neo-vascularization. The hydrogel aspect continued to change to a granular aspect (fig. 5d). Endothelial cells organized around the erythrocyte-rich domains and formed capillary

neo-vessels (fig. 5e and 5f). Interestingly, at this step of healing, colonized hydrogels could be considered as an incipient dermis devoid of collagen fibrils, with a high cell-content and vascular network in formation.

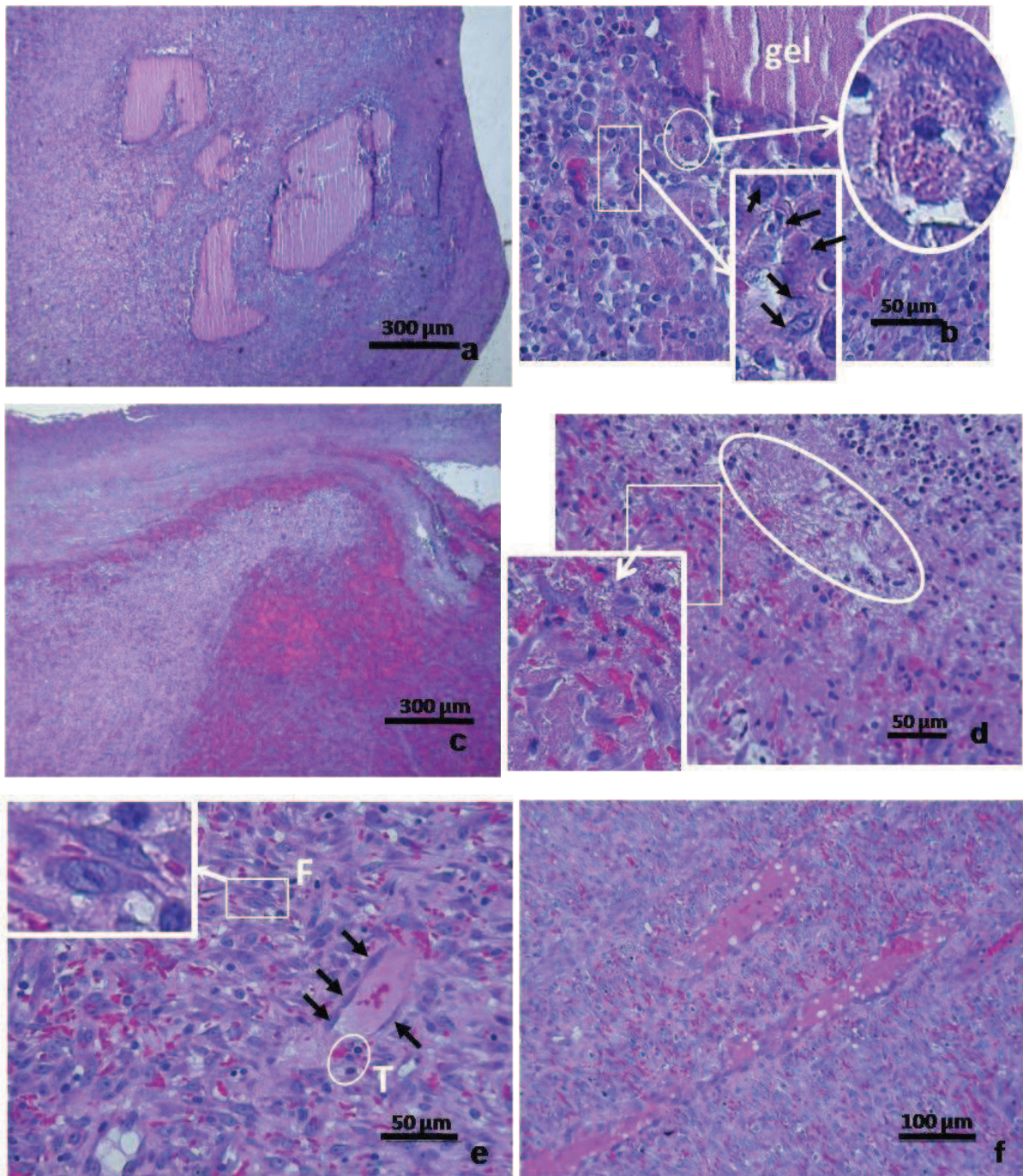


Fig. 5: HE staining of BCPH removed after 4 days of wound healing.

(a) little BCPH fragments surrounded by numerous macrophages and giant polynuclear cells; (b) BCPH particle being gradually phagocytosed : black arrows show giant polynuclear cells; (c) A large amount of erythrocytes infiltrated hydrogel bulk; (d) granular aspect of chitosan (circled), erythrocytes, fibroblasts and endothelial cells (rectangular insert); (e) Endothelial cells (black arrows) organized

around erythrocytes, fibroblasts (F) and T cells (T); (f) Blood vessels forming a well-organized vascular network.

Observations were different from each other depending on the histological slice observed and depending on the selected slice area for observation. At day 4, the same sample could indeed present non-colonized areas and also dermis-like organized areas containing mesenchymal cells and organized blood vessels, depending on the area observed. During the following days of healing, the colonization front continued to move forward in hydrogel bulk, and observations were more like those of fig. 5, non cellularized area becoming gradually more rare and finally impossible to observe.

The studied devices were composed of two different hydrogels, and the effect of such an assembly on the colonization and degradation scheme was visible at intermediate stages (see figure 6). The layer corresponding to the soft hydrogel prepared from the direct neutralization of an aqueous solution is already invaded at day 4 (bottom part), whereas the harder hydrogel (external layer) processed from the alcogel route is mainly composed of non invaded fragments with a few cellularized zones between these fragments (upper part). As a result, although the chitosan wound healing device is partly integrated in the reconstructed skin and acts as a scaffold for a variety of cells, the kinetics of the cell colonization process can be monitored by the physicochemical context of the gelation route, that mainly governs the entanglement density and the mechanical strength of the gels.

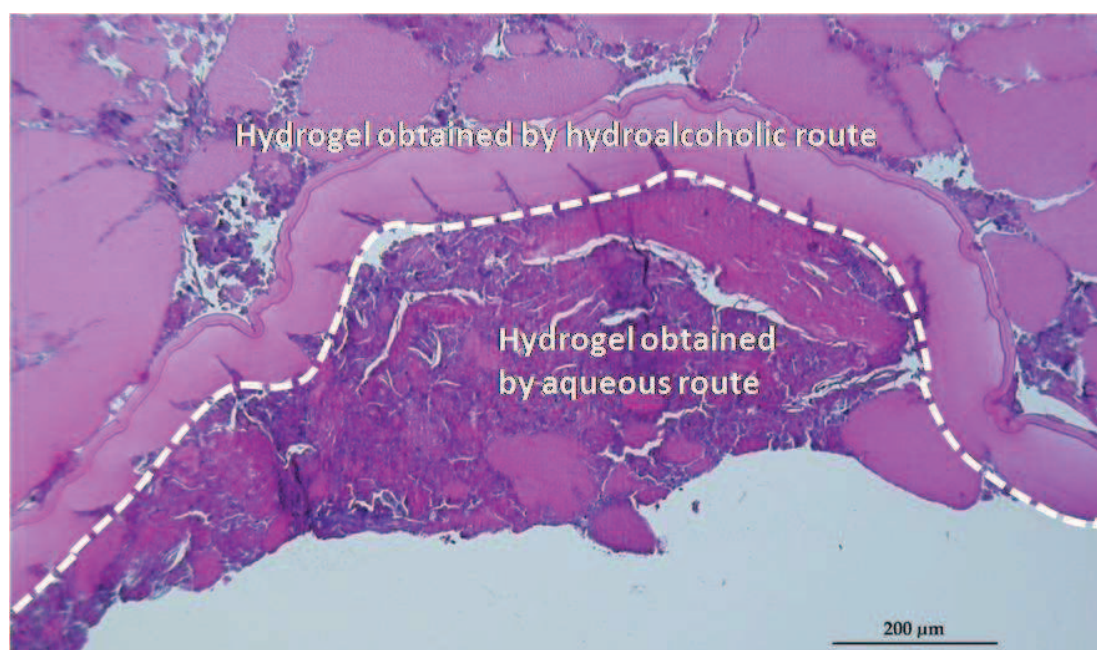
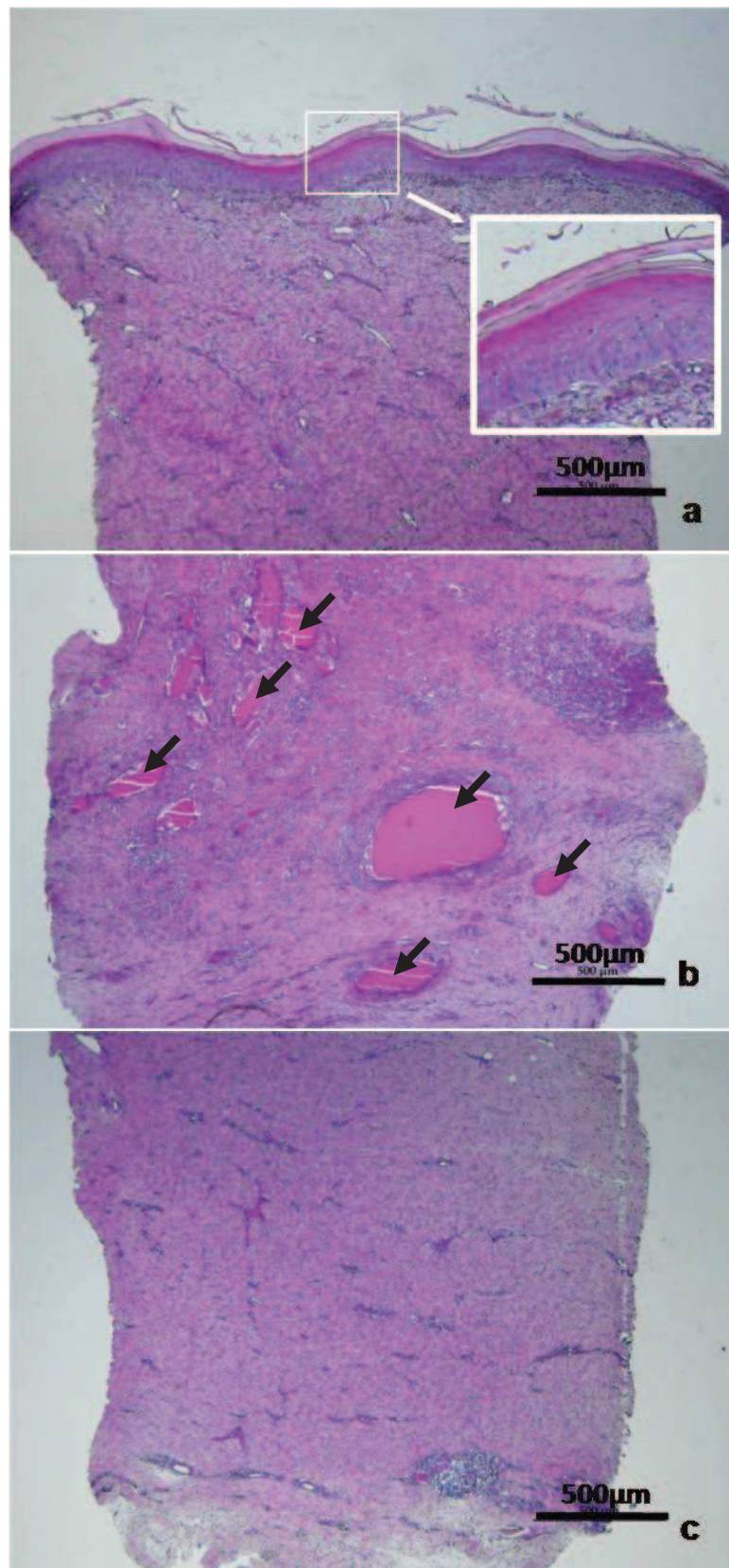


Fig. 6: Different rate of cellular colonization at day 4 depending on the gelation route.

After the experiment, some skin biopsies were performed 31 days after implantation and showed a completely regenerated and well vascularized dermis (Fig. 7a). Epidermis was also of normal organization, but the thickness of the different cellular layers suggested a little remaining inflammation.

Few hydrogels pieces remained at different depths in the dermis (Fig. 7b), depending on the biopsy observed. These BCPH particles are surrounded by macrophages, lymphocytes and giant polynuclear cells. Nevertheless, no clinical sign of inflammation was observed during the experiment.



*Fig. 7 : Skin biopsy after 31 days of healing in presence of BCPH
 (a) Epidermis and upper dermis of normal organization well vascularized dermis. The thickness of cellular layers of epidermis suggest a little remaining inflammation. (b) Some remaining BCPH particles in medium dermis (black arrows). (c) Normal deep dermis and hypodermis.*

4. Discussion

The interest of chitosan physical hydrogels for wound healing has been shown by several authors [3,4], but biological mechanisms involved in the skin regeneration had to be specified.

Apparently, the main event allowing the initial cell invasion of chitosan physical hydrogels is the formation of cracks, possibly resulting from initial dehydration. Such cracks were opened paths and allowed inflammatory cells infiltration. Inflammatory cells are mostly eosinophilic polymorphonuclear cells, capable of the production and secretion of numerous cytotoxic mediators like free-radicals, cytokines, chemokines, granular proteins and lysozymes, nitrogen oxide (NO) able to cause chitosan degradation [8,9]. Different functions have been attributed to eosinophilic polymorphonuclear cells, sometimes contradictory, but it is today well known that eosinophils can be involved in natural or specific immune response and also participate to tissue remodeling and angiogenesis [10].

As a general trend, inflammatory stage is a useful step among wound healing cellular events, which involves various inflammatory cells, including PMN. Chitosan is described as a PMN chemoattractant [11] and according to some authors it would activate complement and production of complement C5a fragment [12]. Complement is also a strong inflammatory cells chemoattractant, which means that chitosan favours directly and indirectly inflammatory cells infiltration (PMNs and macrophages), and so accelerate the first steps of healing.

Chitosan hydrogel degradation observed should be mostly due to PMN cells since these cells release numerous aggressive substances including lysozymes described in literature as a principal cause to chitosan degradation[9]. Since the polymer used in this work is highly deacetylated, this degradation results mainly in the release of poly D-glucosamine oligomer fragments and various chito-oligosaccharides, with low amount N-acetyl-D-glucosamine.

Minagawa et al. [13] showed that oligomers of chitin or chitosan were highly effective in wound healing, and suggested that it is because monomers and oligomers are absorbed faster due to the low molecular weight. These authors observed that fibroblasts were more activated with chitosan of low degree of acetylation, and that collagenase activity is enhanced. The same observation was made by Alsarra et al. who concluded that a low

degree of acetylation make the treatment of wound burns easier because of D-glucosamine release.

So we can consider that degradation of chitosan by lysozymes may play an important role in wound healing by producing active monomers and oligomers. Nevertheless, changes in hydrogel coloration by hemalun-eosin observed during histological analyses suggest other degradation mechanisms than a simple depolymerization. Those additional mechanisms have still to be specified.

The cellular colonization of the softer layers in BCPH is very rapid since at day 4, only small non-colonized areas in hydrogels bulk could be observed. This indicates that the various biological phenomena involved in healing process occurs immediately after implantation and follows each other very quickly, and actually all steps of this biological scenario are observable at day 4. The first step is an inflammatory response with the recruitment and infiltration of PMN and macrophages. In a second step BCPH are degraded and the hydrogel structure is opened to be used by different cell types with the progression of the degradation of the implant by macrophages. In a third stage, dermis-like organization is observed in hydrogels, while skin biopsies show few hydrogels debris in the reconstructed dermis. It's important to note that the large amount of eosinophils observed during the first stage could have been damaging for tissues, while in our case this important inflammatory response seems to be benefic for healing. Eosinophils indeed target chitosan and on any account surrounding tissues. During the second stage, chitosan is almost totally colonized and degraded. Degradation process lead to the formation of a favorable medium for cell differentiation, as shown by cytokeratins production and cells organization. During the last stage, cellular organization is close to an incipient dermis, devoid of collagen fibrils, with a high cell-content and an interesting vascular network in formation. Observations were the same until the end of experiment, and despite the presence of fibroblasts in the hydrogels, no collagen fibers were observed. We can suppose that the start of epithelialization of the wound kept the gel from being in contact with a hydrated medium, resulting on its total drying and final fall.

Skin biopsy after one month showed some remaining gel particles in dermis, nevertheless there were no clinical signs of inflammation or pain. Ueno *et al.* used chitosane lyophilisates for wound healing in dogs [14] and observed that it took about one week for chitosan to be

decomposed on the wound area, but that some pieces were more difficult to be phagocytized by macrophage and so to be cleared away from the wound. They assumed that remaining chitosan promote a faster wound healing process by inducing more migration of inflammatory cells in the wound area, and may be considered to accelerate macrophage migration as long as it remains in the wound. Considering this work, we can assume that remaining BCPH particles may have a positive influence on further healing stages and remodeling.

Moreover, in previous study (*Cf previous chapter*) during which we aimed to evaluate the interest of BCPH for third degree burns healing with the same bilayered chitosan physical hydrogels, skin biopsies realized after seven months and one year of healing. They showed no remaining hydrogel particles in the dermis. During this one year experiment we observed that the use of BCPH lead to the reconstruction of a well organized skin with mechanical properties close to those of native skin. No clinical inflammation or pain was observed. Ribeiro *et al.* also used chitosan physical hydrogels (obtained by aqueous route) for burns healing in Wistar rats [4]. They observed no specific inflammation or granuloma during histological analyses, and also concluded to the good local and systemic histocompatibility of the physical hydrogels and to the promoting role of chitosan hydrogels for skin wound healing.

In conclusion, this *in vivo*-experiment confirmed the observation of Bilayered Chitosan Physical Hydrogels cell colonization after implantation in surgical wounds of the dermis on a pig model (*Cf previous chapter*). The wound healing process starts immediately after implantation and involves a rapid succession of interdependent biological and physicochemical phenomena. Histological analyses showed that the first cells infiltrating hydrogels are inflammatory cells, especially eosinophilic polymorphonuclear cells. It leads to (i) the degradation of chitosan producing oligomers and monomers which were found in literature to enhance wound healing, and (ii) the increase of the micron-range porosity of the gels that favors invasion and differentiation of cells within the scaffold.

The increase of inflammatory cells in the wound, especially PMN and macrophages promotes fibroblasts activation and in this way wound healing. In the hydrogel device, inflammatory cells are quickly followed by mesenchymal cells, and endothelial cells

arrangement around erythrocytes leads to the formation of neo-vessels organized like a vascular network.

Physical chitosan multilayered assemblies appear to be particularly interesting for wound healing, especially because such matrices are similar to the glycosaminoglycans natively present in extracellular matrix. Such effect was previously described in the frame of the concept of 'decoy of biological media' for cartilage tissue engineering in vitro [2]. In this work, in vivo experiment evidence that such a decoy effect is not restricted to one type of cells and in vitro conditions, since different cells show an important affinity for chitosan hydrogels. However in vivo degradation orients the biological response towards a scaffold effect with cells invasion of the implants, whereas no cell colonization was observed in vitro in absence of inflammatory cells [2]. The exact role of the chitosan degradation products and the biological paths responsible of this degradation still have to be studied.

5. References

- [1] S. Ladet, L. David, and A. Domard, Multi-membrane hydrogels, *Nature*, 452 (2008) 76-U6.
- [2] A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. T. Corvol, and A. Domard, A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering, *Biochimie*, 88 (2006) 551-564.
- [3] N. Boucard, C. Viton, D. Agay, E. Mari, T. Roger, Y. Chancerelle, and A. Domard, The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns, *Biomaterials*, 28 (2007) 3478-3488.
- [4] M. P. Ribeiro, A. Espiga, D. Silva, P. Baptista, J. Henriques, C. Ferreira, J. C. Silva, J. P. Borges, E. Pires, P. Chaves, and I. J. Correia, Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing, *Wound Repair Regen.*, 17 (2009) 817-824.
- [5] C. Schatz, C. Viton, T. Delair, C. Pichot, and A. Domard, Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution, *Biomacromolecules*, 4 (2003) 641-648.
- [6] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium, *Biomaterials*, 26 (2005) 933-943.
- [7] A. Montembault, C. Viton, and A. Domard, Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent, *Biomacromolecules*, 6 (2005) 653-662.

- [8] V. Decot, Le polynucléaire éosinophile, *La presse médicale*, 35 (2006) 113-124.
- [9] S. Hirano, H. Tsuchida, and N. Nagao, N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis, *Biomaterials*, 10 (1989) 574-576.
- [10] L. Prin, Données nouvelles sur l'éosinophile et l'éosinophilie, *La presse médicale*, 35 (2006) 111-112.
- [11] Y. Usami, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi, N. H. Kumazawa, S. Tanioka, and Y. Shigemasa, Chitin and Chitosan Induce Migration of Bovine Polymorphonuclear Cells, *Journal of Veterinary Medical Science*, 56 (1994) 761-762.
- [12] Y. Usami, S. Minami, Y. Okamoto, A. Matsushashi, and Y. Shigemasa, Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells, *Carbohydrate Polymers*, 32 (1997) 115-122.
- [13] T. Minagawa, Y. Okamura, Y. Shigemasa, S. Minami, and Y. Okamoto, Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing, *Carbohydrate Polymers*, 67 (2007) 640-644.
- [14] H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, T. Kadosawa, and T. Fujinaga, Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs, *Biomaterials*, 20 (1999) 1407-1414.

4^{ème} partie : Etude nano-structurale du tissu cutané

Pour étudier la structure d'un tissu vivant, la technique la plus courante est la microscopie électronique en transmission (TEM) qui fournit des informations structurales dans une gamme d'échelle allant de la centaine d'angströms jusqu'à plusieurs microns. Toutefois les échantillons doivent subir plusieurs traitements avant d'être observés (fixation=réticulation, déshydratation, inclusion, contraste, etc.), traitements connus pour modifier certains paramètres structuraux à différentes échelles [5]. Pour cette raison nous avons cherché une technique complémentaire qui ne requiert pas de modification chimique du tissu et permet d'estimer l'organisation structurale du tissu avant que celui-ci ne subisse des dommages irréversibles. La diffusion des rayons X aux petits angles répond à de tels critères et est à même de nous fournir des informations sur la structure du derme et en particulier sur l'arrangement des faisceaux de fibrilles de collagène à une échelle allant de la dizaine d'angströms à quelque dizaine de nanomètres. Par ailleurs la microscopie électronique donne un aperçu des structures présentes de manière très localisée, alors que le résultat obtenu lors d'une analyse par diffusion X est constitué des contributions de l'ensemble des structures contenues dans la partie de l'échantillon soumise au faisceau incident.

Par la combinaison des deux techniques (TEM et SAXS) nous nous sommes fixé un double objectif :

- la validation de l'utilisation de la diffusion des rayons X pour caractériser la structure du tissu cutané, et

- l'évaluation la qualité de la cicatrisation cutanée en présence d'hydrogels physiques de chitosane et de Tulle Gras®. En effet comme nous l'avons évoqué dans la première publication (chapitre 3, 2^{ème} partie), les propriétés mécaniques des différents tissus testés ne sont pas les mêmes et nous avons émis l'hypothèse que ces différences étaient pour partie dues à des organisations différentes du réseau de fibres de collagène dans chacun des cas. La présente étude de diffusion des rayons X a été mise en place pour vérifier cette hypothèse.

La première étape de ce travail a été une étude de faisabilité menée afin de déterminer les conditions idéales de conservation des prélèvements avant leur passage sous faisceau synchrotron (expérimentation E2). Comme évoqué dans le chapitre « protocoles expérimentaux », nous avons également cherché à établir une cartographie de l'organisation du collagène selon la zone de prélèvement.

1. Résultats de l'étude de faisabilité

L'observation sous faisceau synchrotron des prélèvements réalisés sur le dos d'un porc charcutier ont conduit à l'obtention d'un grand nombre d'images de diffusion (*figure 43*). Ces images représentent l'intensité diffusée collectée selon l'angle de diffusion θ . L'intensité diffusée est fonction du vecteur de diffusion q , défini par :

$$q=(4\pi/\lambda).\sin(\theta)$$

où 2θ est l'angle de diffusion et λ la longueur d'onde du faisceau incident.

La première étape de l'analyse des images de diffusion consiste en une calibration des valeurs de q . Pour cela on utilise l'intensité diffusée par le behenate d'argent (AgBe). En effet ce composé présente un anneau de diffraction caractéristique à $q=0.1076 \text{ \AA}^{-1}$ ainsi que les 11 harmoniques, et nous permet d'avoir une bonne précision dans l'estimation des valeurs de q .

On peut alors choisir d'étudier l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion q , en moyennant cette intensité selon l'ensemble des angles azimutaux, on obtient alors une information sur la morphologie et la taille caractéristique des structures présentes dans l'échantillon (*figure 44*). On peut également choisir d'étudier l'intensité diffusée selon l'angle azimutal en moyennant l'ensemble des intensités diffusées pour toutes les valeurs de q , on obtient alors une information sur l'isotropie (ou au contraire l'anisotropie) de l'échantillon (*figure 45*).

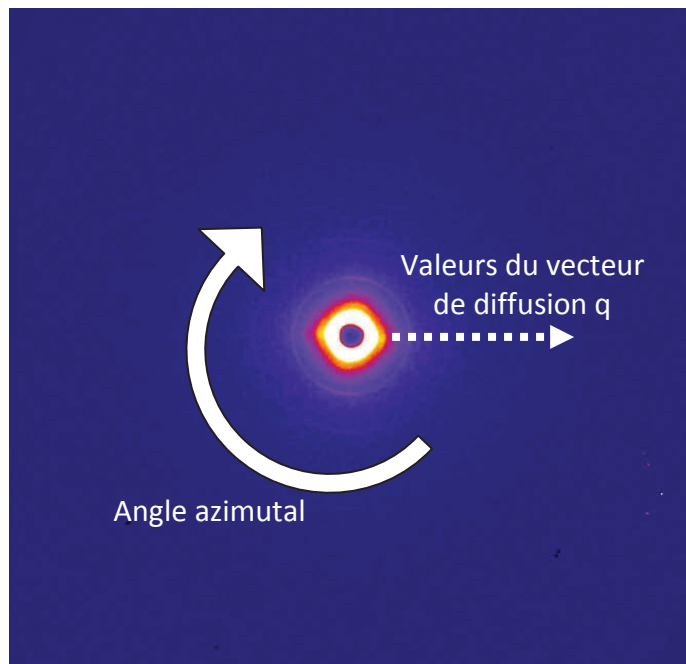


Figure 43 : intensité diffusée par une biopsie de peau (épiderme+derme) prélevée sur le dos du porc charcutier. L'image peut-être étudiée par secteurs, c'est-à-dire selon les différents angles azimutaux, ou bien selon les valeurs de q , en moyennant l'intensité diffusée aux différents angles azimutaux.

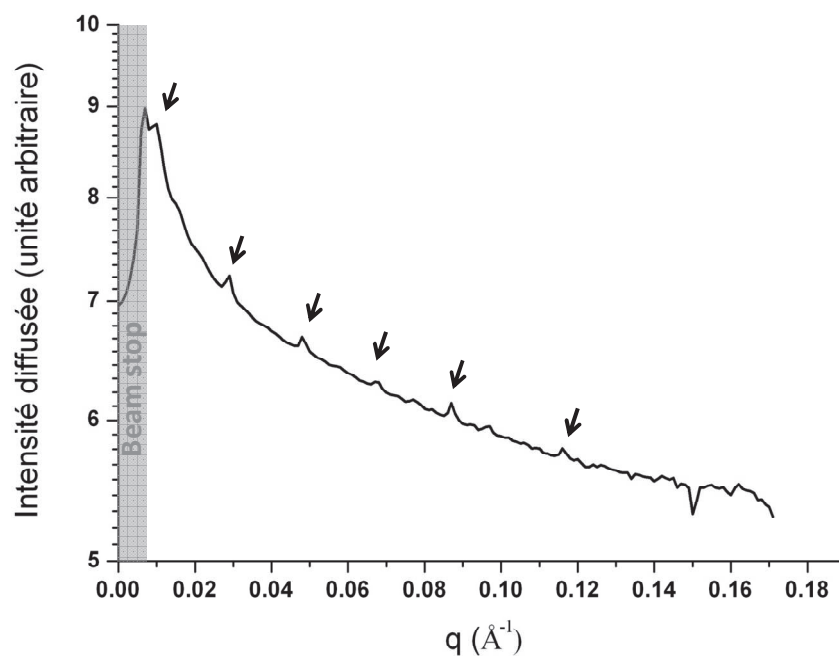


Figure 44 : Intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion q après un regroupement azimutal autour du centre d'une image de diffusion somme celle de la figure 43. Chaque maximum (pic de diffusion) traduit une longueur caractéristique d'une périodicité de densité électronique dans l'échantillon (ici dans les fibrilles de collagène du derme porcin).

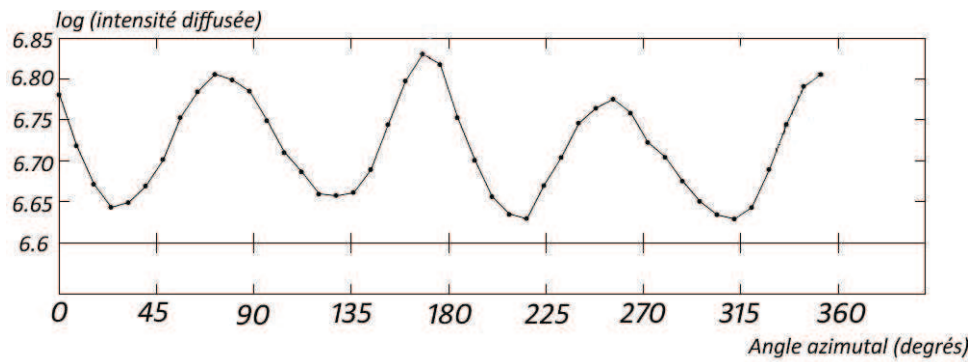


Figure 45 : Intensité diffusée en fonction de l'angle azimutal après intégration sur tous les vecteurs de diffusion. Les variations de l'intensité diffusée indiquent que l'organisation de l'échantillon est anisotrope. On note deux orientations privilégiées sensiblement perpendiculaires.

Les images et diagrammes de diffusion obtenus sont à rapprocher de la structure réelle du tissu observé, afin d'identifier les éléments diffusants. Si l'on considère les observations réalisées en microscopie électronique (figure 46), il apparaît que les éléments les plus aptes à diffuser sont les fibres de collagène. Ceci nous amène à considérer plus précisément la morphologie de ces fibres et des faisceaux formés par celles-ci (figure 47) afin d'identifier l'origine des pics de diffusion (figure 48).

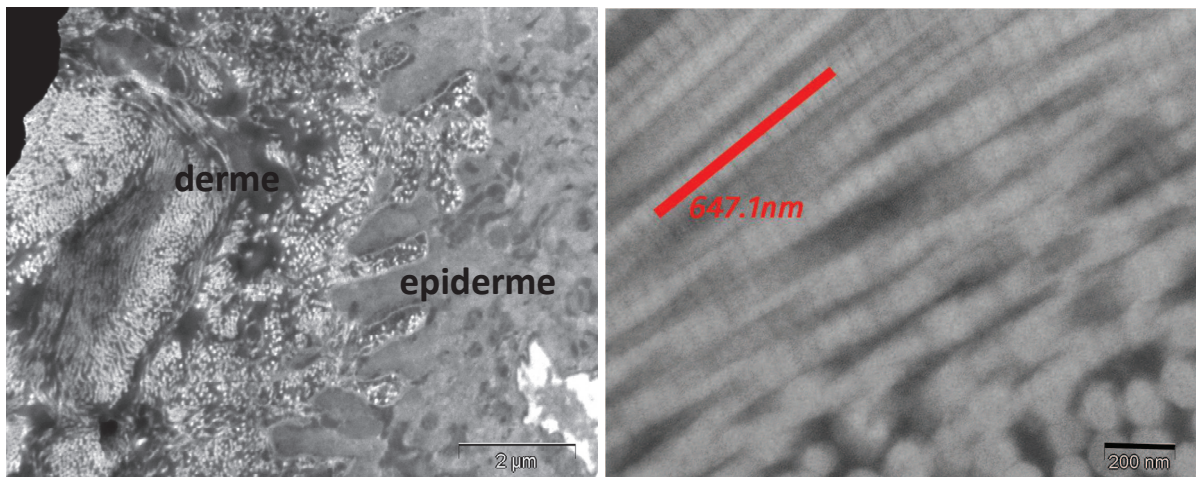


Figure 46 : observation TEM d'une biopsie cutanée réalisée sur le dos du porc charcutier (fixation tetroxyde d'osmium, contraste acétate d'uranyle et citrate de plomb). On observe dans le derme une densité importante de fibres de collagène. Les stries observées sont liées à l'organisation des triple-hélices de tropocollagène qui forment les fibrilles (10 stries = 64.71 nm). Images réalisées au centre d'étude des microstructures CTµ, Université Claude Bernard Lyon 1, en collaboration avec P. Alcouffe.

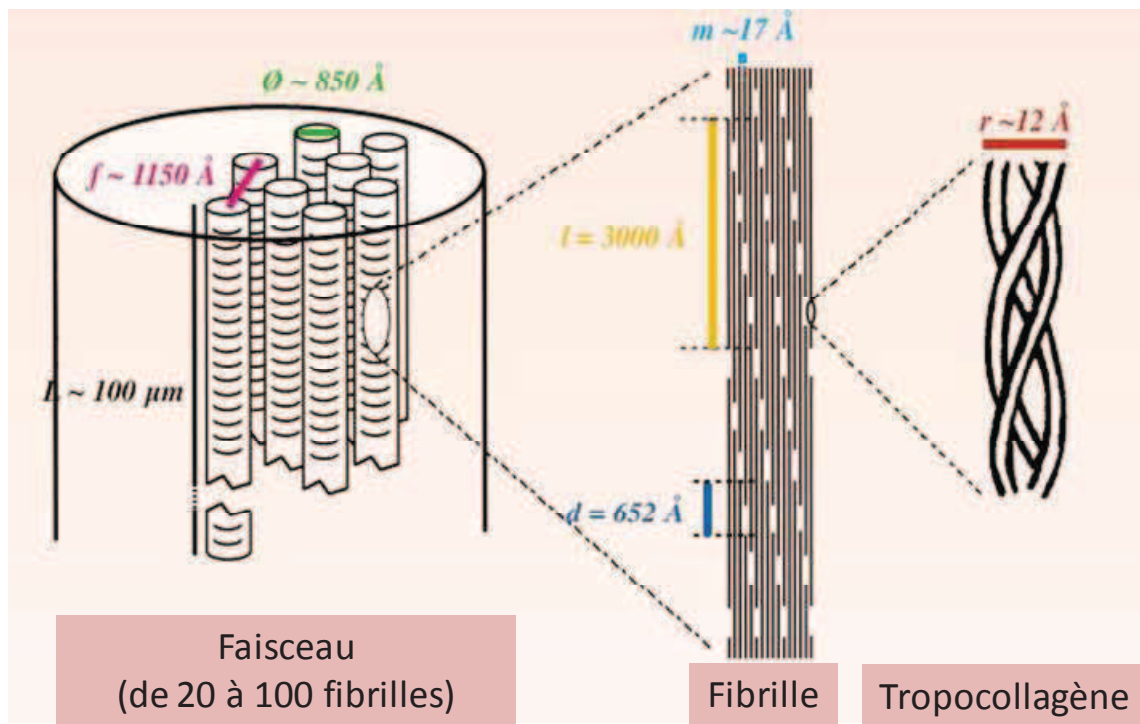


Figure 47 : morphologie et organisation des fibrilles de collagène. D'après [6]

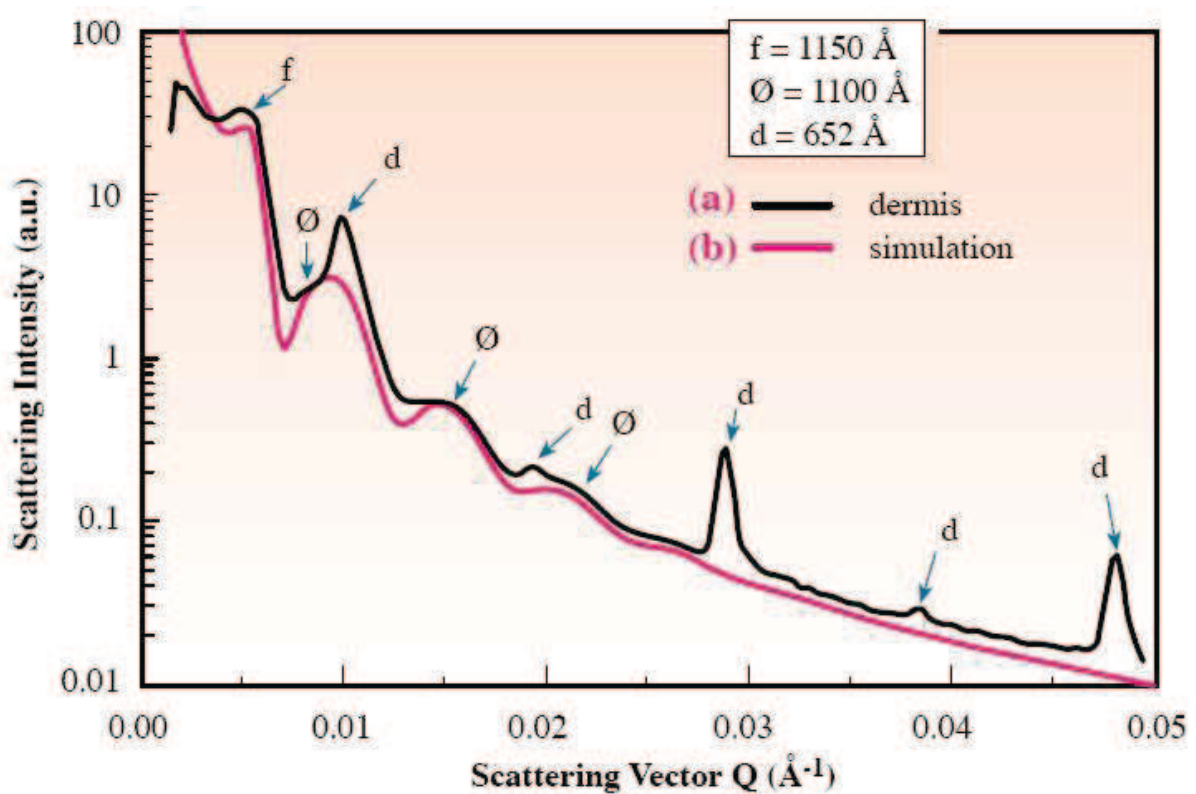


Figure 48 : Relation entre le profil de diffusion et la structure du collagène dans les tissus. (modèle proposé par Merigoux et al.[6])

La réponse du collagène est liée à la périodicité intra-fibrillaire, aux fibrilles ainsi qu'à l'organisation de celles-ci en faisceaux. La diffusion due à la périodicité intra-fibrillaire est

difficile à dissocier de la diffusion due à la morphologie fibrillaire du fait des ordres de grandeurs similaires des entités diffusantes. C'est pourquoi il peut être intéressant de procéder à l'étude des images de diffusion par secteurs, puisque l'arrangement et la morphologie fibrillaires d'une part et la périodicité intra-fibrillaire d'autre part engendrent des phénomènes de diffusion dans des directions différentes.

L'objectif principal est d'utiliser la diffusion des rayons X pour évaluer la qualité du tissu cicatriciel généré en présence d'hydrogel de chitosane, en comparaison avec le tissu sain et le tissu régénéré en présence de Tulle Gras®. En effet l'organisation du réseau de collagène joue un rôle important dans les propriétés mécaniques des tissus, or nous l'avons vu la réponse des tissus cicatriciels et du tissu sain diffèrent (Cf chapitre 3, 2^{ème} partie) et l'étude du réseau de collagène et de son organisation pourrait nous permettre de mieux comprendre ces différences.

Dans le but de déterminer les conditions de conservation des échantillons de peau pour l'analyse ultérieure des tissus prélevés dans le cadre de l'expérimentation E1, nous avons étudié l'évolution du profil d'intensité diffusée par le même prélèvement de tissu au cours des 8 heures suivant le prélèvement. Les résultats obtenus sont présentés dans la *figure 49a*, ils montrent que le profil d'intensité diffusée ne change pas ou peu au cours des huit premières heures. Il s'avère donc que la conservation (dans l'eau stérile) à température ambiante des prélèvements peut se prolonger suffisamment longtemps sans que l'analyse soit significativement altérée.

De la même manière les résultats obtenus à partir de biopsies avant et après conservation à 4°C d'une part et à -18°C d'autre part se sont avérés en complète conformité (*Figure 49b*).

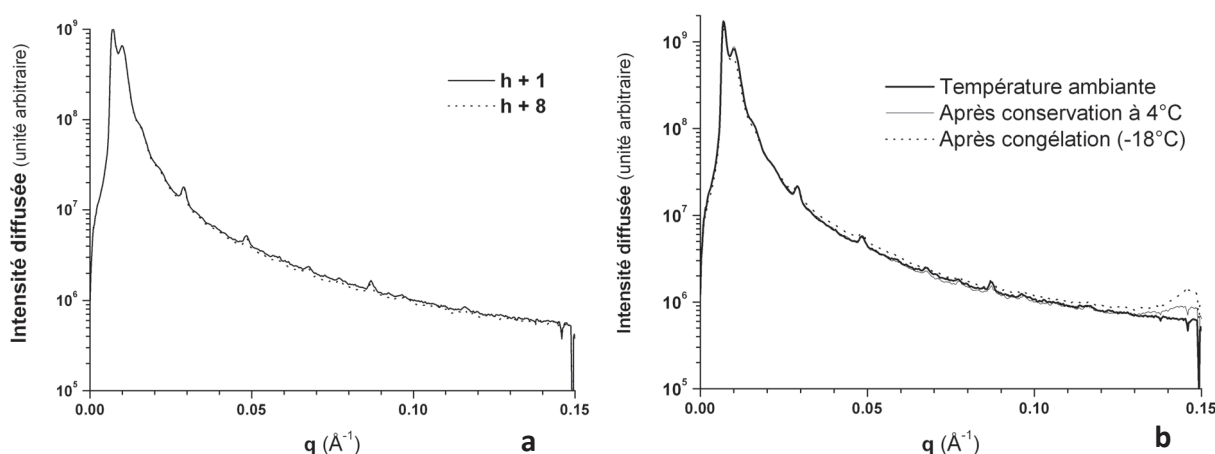


Figure 49 : Intensité diffusée par un même échantillon de peau 1 h et 8 h après le prélèvement (a) et selon les conditions de conservation (b).

Dans le cadre de l'expérimentation E1, les tissus à analyser sont prélevés sur des sites différents (zone de prélèvement thoracique ou dorsale, médiale ou latérale). Nous nous sommes donc interrogés sur l'influence du site de prélèvement sur l'organisation du réseau de collagène, afin de s'assurer de la significativité des comparaisons effectuées entre les prélèvements cicatriciels, les cicatrices témoins et les tissus sains. En effet une étude a montré que dans le cas de la peau de veau les fibres de collagène sont majoritairement orientées parallèlement à l'axe de la colonne vertébrale correspondant à une direction perpendiculaire à celle des mouvements de peau dus aux déplacements de l'animal, et aux mouvements effectués lorsqu'il s'alimente [7]. Le degré d'orientation est d'autant plus important que la peau est sollicitée au cours des mouvements de l'animal. Nous avons souhaité dresser le même type de cartographie pour le modèle animal de notre étude, à savoir le porc.

Ainsi l'étude de l'intensité diffusée a été automatisée, et pour chacun des 121 sites biopsiés nous avons étudié un certain nombre de paramètres permettant de caractériser le profil d'intensité diffusé (*figure 50*).

Pour chaque secteur azimutal, le pic de diffraction associé au collagène au voisinage de $q=0.0291\text{\AA}^{-1}$ (ordre $n=3$) est déterminé par une estimation du reste du diagramme (contribution de la diffusion par les fibrilles) par interpolation de part et d'autre du pic par une loi du type $I=A/q^a$, soit un comportement linéaire en échelles log-log.

Il est ainsi possible de suivre l'évolution de la contribution de la périodicité intra fibrillaire en fonction de l'angle azimutal, ce qui donne une information sur la quantité de fibrilles orientées dans le plan principal du derme (on ne voit pas les fibrilles orientées hors de ce plan), et dans un secteur azimutal donné.

L'analyse azimutale des courbes d'intensité du pic d'ordre 3, $I_3(q=0.00291\text{\AA}, \varphi)$ est analysée en autorisant deux familles principales d'orientations, la famille (1) et la famille (2), en supposant une distribution gaussienne des angles d'orientations fibrillaire dans chaque famille :

$$I_3(q=0.00291\text{\AA}, \varphi) = I_1 \cdot \exp(-0.5 * [(\varphi - P1)/w1]^2) + I_2 \cdot \exp(-0.5 * [(\varphi - P2)/w2]^2)$$

En gérant en plus les symétries selon l'angle φ (et $\varphi+180^\circ$) et la périodicité à 360° .

Cette distribution d'intensité donne donc accès à différents paramètres d'orientation des fibrilles:

- Les intensités diffusées maximales I_1 et I_2 , l'intensité I_{\max} , correspondant à la plus haute de ces deux valeurs.
- Les angles azimutaux P_1 et P_2 correspondant aux pics d'intensités diffusées maximales des deux familles (1) et (2)
- Les largeurs à mi-hauteur des pics de diffusions w_1 et w_2
- Le « background », correspondant à l'intensité seuil

Par ailleurs nous avons procédé, pour chaque prélèvement, au calcul de la fonction d'orientation d'Hermans f par rapport à l'axe horizontal $\varphi=0$ et correspondant systématiquement à l'axe sagittal, d'après:

$$\langle \cos^2(\varphi) \rangle = \frac{\int_0^{360} \cos^2(\varphi) \cdot \sin(\varphi) I(q \sim q_3; \varphi) d\varphi}{\int_0^{360} \sin(\varphi) I(q \sim q_3; \varphi) d\varphi}, \quad \text{avec } q_3 \sim 0.0291 \text{\AA}^{-1}$$

et $f = (3/2) \cdot \langle \cos^2(\varphi) \rangle - 1/2$

Si les fibrilles sont toutes orientées à $\varphi=0$ (orientation sagittale), alors $\langle \cos^2(\varphi) \rangle = 1$ et $f=1$; si les fibres sont toutes orientées à $\varphi=90^\circ$ (orientation transverse), alors $\langle \cos^2(\varphi) \rangle = 0$ et $f=-1/2$; et enfin si les fibrilles sont distribuées de façon isotrope dans le plan principal du derme, alors $\langle \cos^2(\varphi) \rangle = 1/3$ et $f=0$.

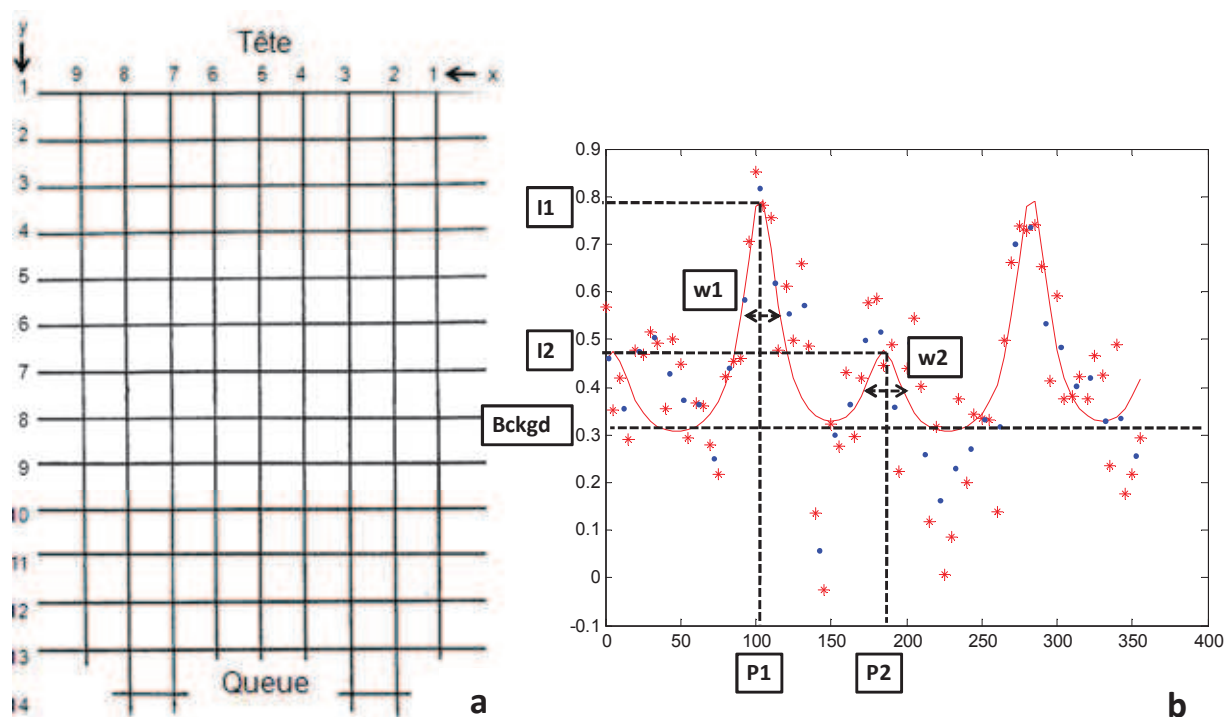


Figure 50 : (a) les 121 sites de prélèvements de coordonnées (x_i, y_j) ; (b) Intensité diffusée en fonction de l'angle azimutal et matérialisation des 7 grandeurs permettant de caractériser l'intensité diffusée.

L'étude de chacun de ces paramètres, ainsi que de la fonction d'orientation selon la localisation du prélèvement nous a permis de dresser différentes cartographies (figure 51). Il en résulte que la variation de chacun de ces paramètres est assez aléatoire. Par ailleurs les valeurs calculées pour la fonction d'orientation, comprises entre 0 et 1, indiquent une orientation structurale au sein du derme avec des fibrilles plutôt orientées de façon sagittale, mais sans réelle tendance en fonction de la localisation du prélèvement. Toutefois la caractérisation de la structure demeure locale puisque les valeurs de I_1 , I_2 d'une part, et de P_1 et P_2 d'autre part, fluctuent d'un site à l'autre de manière importante. Ceci pourrait être dû à la parenté de taille du faisceau synchrotron incident par rapport à la taille des faisceaux de fibrilles de collagène. En effet, suivant l'endroit où se produit l'analyse (sections de $\sim 0.1 \times 0.3 \text{ mm}$), les faisceaux de fibrilles éclairés par le faisceau incident, et orientées dans le plan principal du derme ne sont peut-être pas assez nombreux pour conduire une caractérisation réellement statistique de l'orientation des fibres. Un faisceau plus large aurait peut-être été souhaitable dans ce cas, mais ce choix aurait limité la gamme de vecteurs de diffusion accessibles.

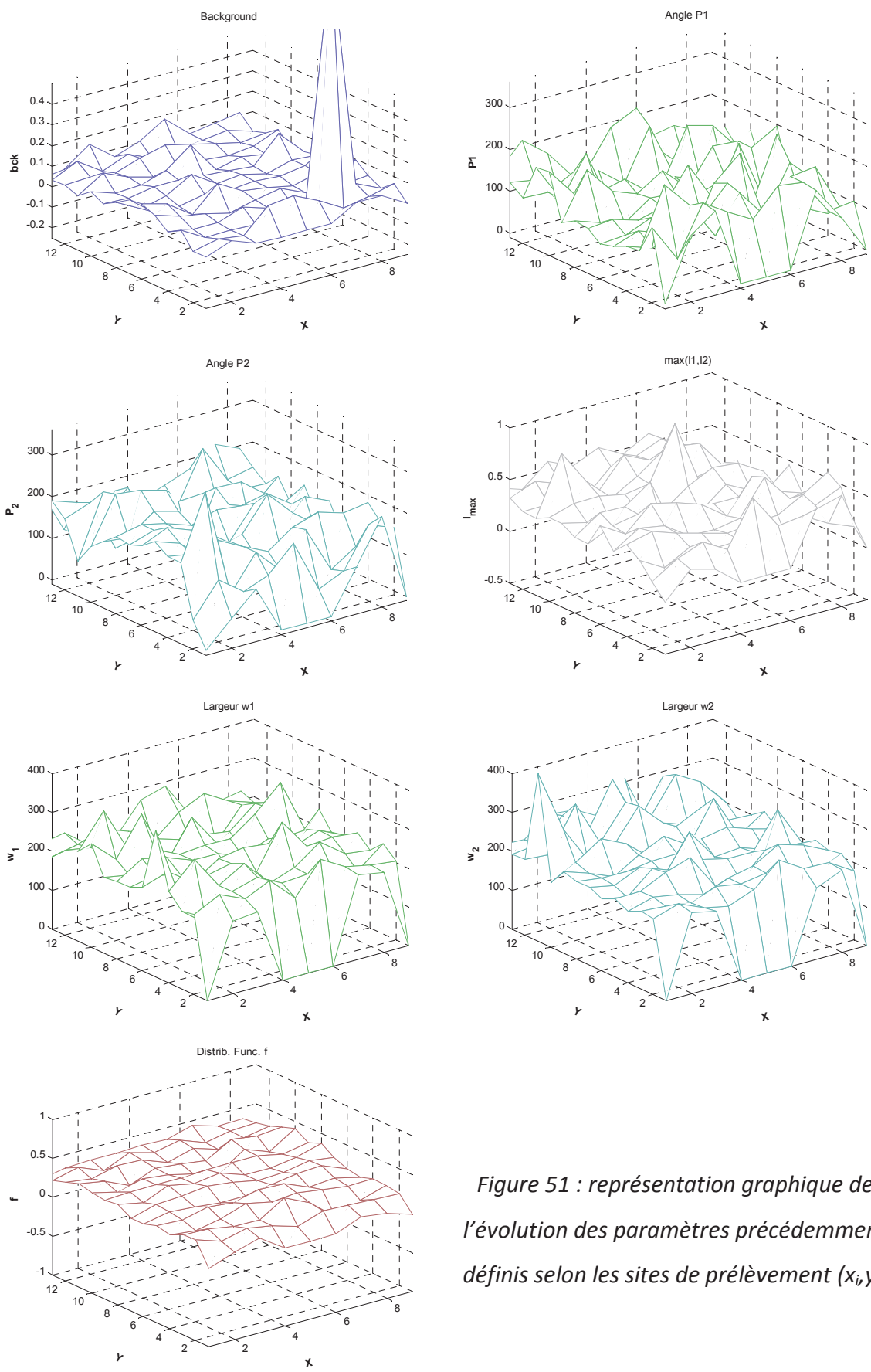


Figure 51 : représentation graphique de l'évolution des paramètres précédemment définis selon les sites de prélèvement (x_i, y_i)

Globalement, on peut donc conclure à une orientation préférentielle du réseau de collagène dans la direction sagittale. Les caractérisations par diffusion X aux petits angles sont délicates, elles ont ici un caractère assez local, avec des fluctuations importantes de l'orientation des fibres de site en site. Globalement, il n'y a pas d'impact de la localisation du prélèvement sur l'organisation du réseau de collagène. Ceci nous a donc permis de conclure que dans le cadre de l'étude des tissus cicatriciels (expérimentation E1) nous pouvions nous affranchir de ce paramètre et comparer des échantillons provenant de différentes zones du dos de l'animal.

Pour finir, toujours dans le cadre de l'étude de faisabilité, nous avons soumis une série de prélèvements à des essais de traction, sous faisceau synchrotron. Les essais de traction ont été réalisés sur des bandes de peau (épiderme + derme), les dimensions de la zone utile soumise à l'étirement étant en moyenne de 10mm x 10mm, pour 3mm d'épaisseur environ.

Au cours de chaque essai on a procédé à un cycle de charge/décharge à une vitesse de 2mm/min, pour une charge maximale d'environ 15N (figure 52).

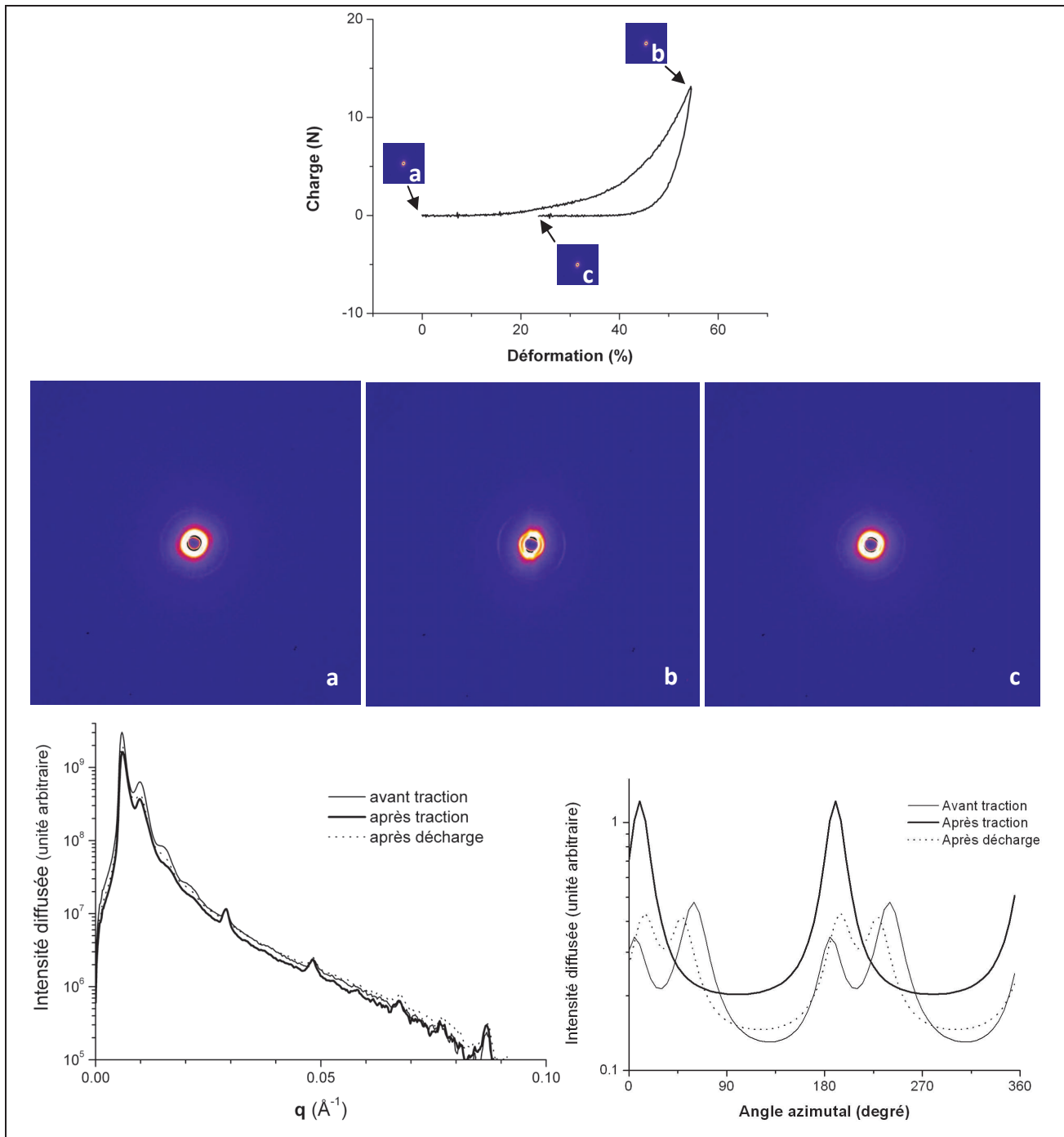


Figure 52 : Etude de l'intensité diffusée par une bande de peau de porc soumis à un essai de traction.

On observe qu'au cours de l'essai de traction l'orientation des fibres de collagène tend vers 180° (c'est-à-dire selon l'axe de traction), mais que le phénomène est réversible. En effet après décharge l'orientation des fibres est similaire à celle observée avant l'essai : la réponse du tissu cutané est élastique.

Cette étude préliminaire menée sur peau saine nous a permis d'optimiser les paramètres d'étude sous faisceau synchrotron pour l'étude des prélèvements cutanés réalisés dans le cadre de l'expérimentation E1. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie suivante.

2. Etude de la structure du tissu cutané après sept mois de cicatrisation dans le cadre de l'expérimentation (E1).

Après 7 mois de cicatrisation, les cicatrices antérieures des 5 animaux de l'étude E1 ont été prélevées, dégraissées pour ne conserver que le derme et l'épiderme, conservées à 4 °C et analysées par diffusion des rayons X. Pour chaque cicatrice un prélèvement en forme de « T » a été réalisé selon le schéma de la *figure 53*. Une série d'images de diffusion a ainsi pu être obtenue grâce à un balayage des cicatrices selon deux directions.

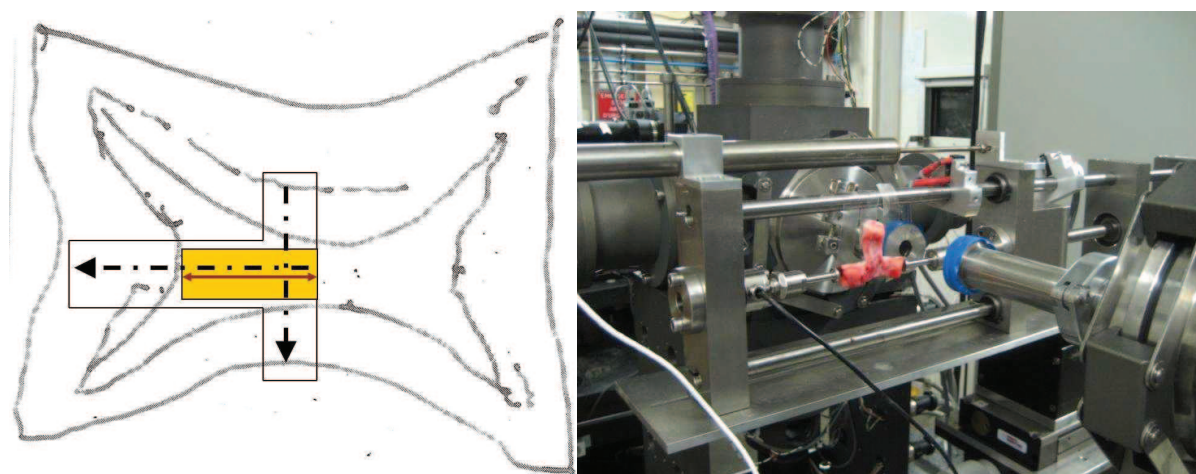


Figure 53 : à gauche, schéma du prélèvement réalisé sur chaque cicatrice. Les flèches indiquent le balayage réalisé avec le faisceau et le rectangle jaune la zone qui a ensuite été redécoupée et soumise à un essai de traction, toujours sous faisceau. A droite, photo prise sur la ligne D2AM, ESRF lors du positionnement de l'échantillon.

Le balayage effectué le long des cicatrices n'a pas révélé de variations structurales régulières, c'est pourquoi nous avons choisi ici de présenter uniquement les résultats obtenus en zone saine, et au cœur de la zone cicatricielle (*figure 54*).

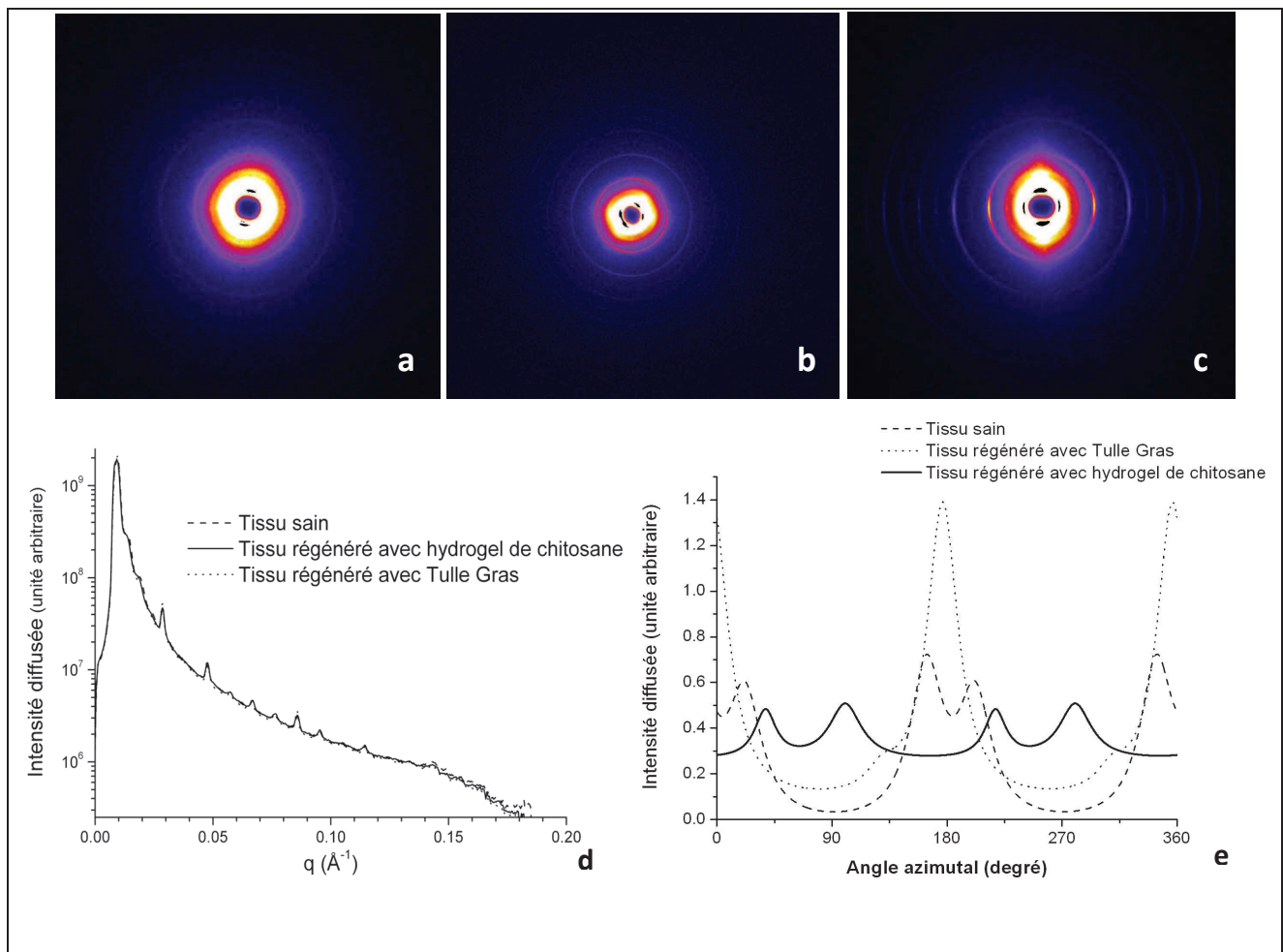


Figure 54 : en haut : Images de diffusion obtenues pour a) une zone saine ; b) une zone de peau régénérée en présence de chitosane ; c) une zone de peau régénérée en présence de Tulle Gras. En bas : intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde q (d) et en fonction de l'angle azimutal pour le pic correspondant à l'harmonique d'ordre 3 (e) pour les deux types de tissus cicatriciels et pour les tissus sains.

Les résultats ne montrent pas de différences structurales majeures (figure 54d) : les fibres sont de morphologie et taille similaires, le profil de diffusion en dehors des pics dus à la périodicité intrafibrillaire restant le même dans les trois cas. Toutefois si on s'intéresse cette fois à l'étude de l'intensité diffusée selon l'angle azimutal, malgré certaines fluctuations, on note une différence significative entre les échantillons (figure 54e). Le collagène du tissu sain est principalement orienté selon deux directions privilégiées (presque perpendiculaires), tandis que le tissu régénéré en présence de Tulle® Gras présente une seule orientation, proche de 180°. Les résultats obtenus avec les hydrogels sont intermédiaires à ces deux cas de figure : on observe deux orientations, mais formant un angle d'environ 60° et centrées autour de l'axe 180°.

Cette observation doit cependant être nuancée : en effet il s'agit d'une tendance généralement observée, appelant à l'étude d'un plus grand nombre de prélèvements, sur de plus nombreuses cicatrices. La différence de structure du derme entre un tissu sain et cicatriciel semble donc plutôt provenir de l'organisation suprafibrillaire, c'est-à-dire la distance interfibrillaire (non étudiée ici à cause de la limite inférieure de la gamme de vecteurs de diffusion accessibles), la taille et l'orientation des faisceaux de fibrilles. La taille des fibrilles individuelles n'est pas significativement affectée par la cicatrisation et le mode de cicatrisation, après 7 mois de remodelage.

Après recoupe des échantillons nous avons procédé, sous faisceau synchrotron, à des essais de traction sur les trois types de tissus (sain, régénéré avec hydrogels de chitosane et régénéré avec Tulle Gras). Les essais de traction ont été réalisés sur des bandes de peau (épiderme + derme), les dimensions de la zone utile soumise à l'étirement étant en moyenne de 10mm x 10mm, pour 3mm d'épaisseur environ.

L'essai réalisé est un cycle de charge/décharge à une vitesse de 2mm/min, pour une charge maximale d'environ 50N (figure 55).

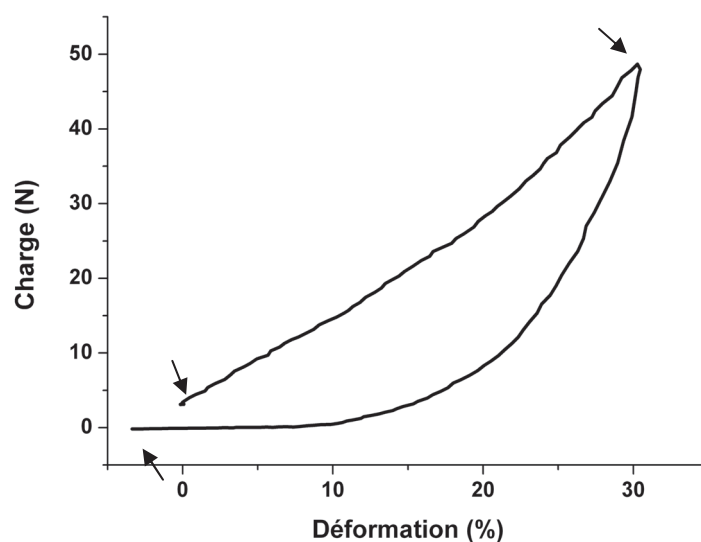


Figure 55 : cycle de charge/décharge auquel ont été soumis les tissus cicatriciels et les prélèvements de tissu sain. Les images obtenues avant la charge, après la charge et après la décharge (flèches) ont été étudiées et comparées.

L'intensité diffusée a été étudiée selon l'angle azimutal (figure 56). Pendant l'essai de traction, les fibres s'orientent dans le sens de la traction, ce qui implique un maximum de

diffusion à 180°. Toutefois, nous l'avons précédemment évoqué, selon la zone observée (et du fait de la taille limitée du faisceau) le collagène peut-être localement plus ou moins orienté dans différentes directions. Dans chaque cas au cours de l'essai de traction, les deux pics de diffusion correspondant aux deux orientations privilégiées tendent à se rapprocher de l'axe de traction (180°). En plus de la caractérisation de la réponse élastique et la recouvrance de la déformation du tissu testé, il est donc possible de quantifier l'orientation et la recouvrance vers un état moins orienté lorsque le réseau de collagène retrouve son organisation initiale après décharge.

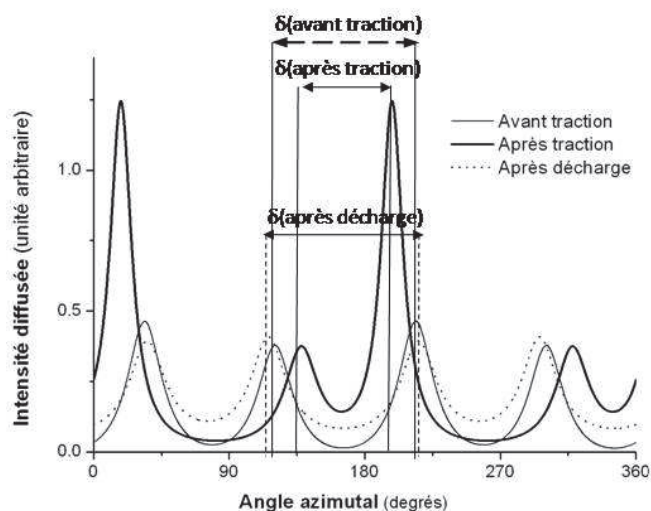
Toutefois au cours de nos mesures, l'orientation initiale des fibrilles de collagène et surtout la valeur d'angle séparant les deux orientations principales dans chacun des prélèvements étudiés ne sont pas les mêmes, aussi il est impossible de comparer ce paramètre de manière absolue. Pour s'affranchir en partie de ce problème d'hétérogénéité de l'orientation initiale, nous avons choisi de comparer pour chacun des types d'échantillons étudiés les rapports $\delta(\text{après traction})/\delta(\text{avant traction})$ et $\delta(\text{après décharge})/\delta(\text{avant traction})$; où δ représente en degrés l'angle séparant les deux orientations privilégiées adoptées par les fibres de collagène (Figure 56a). Ce paramètre caractérise ainsi l'orientation fibrillaire et la recouvrance structurale associée à l'orientation des fibres de collagène.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 57. On observe que le rapport $\delta(\text{après traction})/\delta(\text{avant traction})$ est plus faible pour le tissu régénéré en présence de chitosane que pour le tissu sain, ce qui pourrait signifier que pour une déformation appliquée, le réseau de collagène dans la cicatrice traité par l'hydrogel physique a plus de facilité à s'orienter pendant l'essai. En revanche la valeur la plus élevée est obtenue pour le tissu régénéré en présence de Tulle Gras®, ce qui signifie que dans ce type de cicatrice les fibres de collagène sont moins mobiles, peut-être à cause d'un réseau de fibrilles plus dense avec plus d'interactions interfibrillaires.

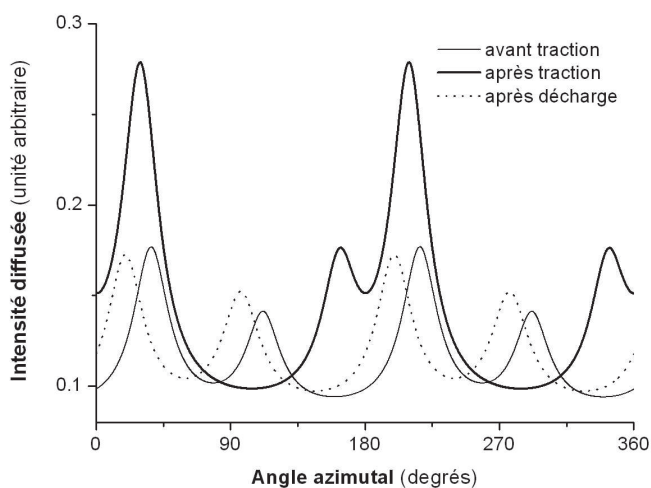
Le paramètre le plus intéressant est sans doute le rapport $\delta(\text{après décharge})/\delta(\text{avant traction})$ puisqu'il correspond à la capacité du réseau de collagène à reprendre son organisation initiale, et donc indirectement il correspond à la recouvrance de déformation du tissu après une sollicitation mécanique. Ce ratio est de 1.07 pour le tissu sain, 0.96 pour le tissu régénéré en présence d'hydrogels de chitosane et 0.88 pour le tissu régénéré en présence de Tulle Gras®.

Ainsi on peut estimer que la réponse élastique du tissu cicatriciel lors de l'essai de traction est plus proche de la réponse du tissu sain lorsque le dispositif cicatrisant utilisé est un

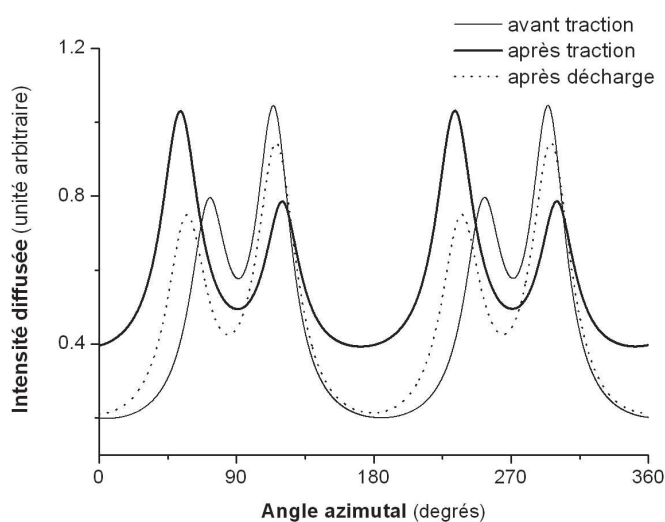
hydrogel de chitosane. Le réseau est moins souple et présente une recouvrance moins marquée après une déformation imposée, ce qui pourrait signifier une rupture de plus d'interactions interfibrillaires ou encore une densité moindre de fibres de réticuline.



a



b



c

Figure 56 : Intensité diffusée par les échantillons de peaux native et cicatricielles au cours d'un cycle de traction. Peau saine (a) ; peau régénérée en présence d'hydrogels de chitosane (b) ; peau régénérée en présence de Tulle Gras® (c)

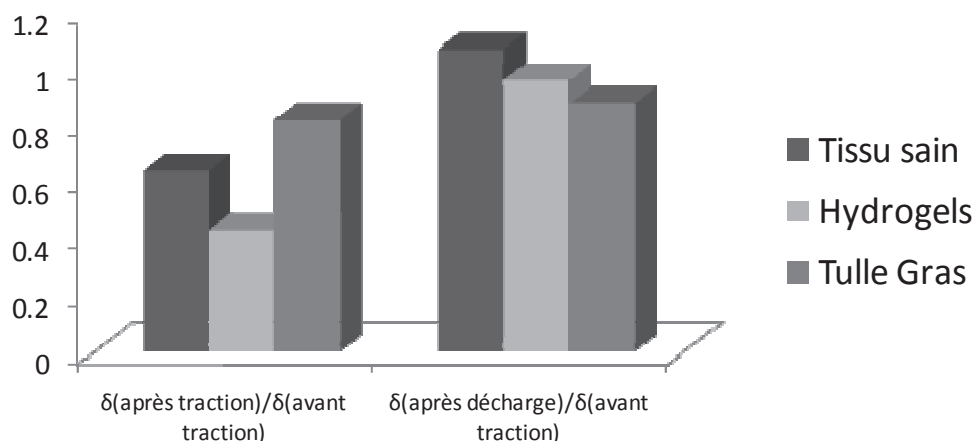


Figure 57 : Comparaison des rapports $\delta(\text{après traction})/\delta(\text{avant traction})$ et $\delta(\text{après décharge})/\delta(\text{avant traction})$ obtenus pour la peau saine, la peau régénérée en présence d'hydrogels de chitosane et la peau régénérée en présence de Tulle Gras®.

En conclusion, l'étude de la structure du réseau de collagène par diffusion des rayons X a révélé :

- que la conservation des échantillons durant les 8 premières heures n'avait pas d'influence sur les résultats observés, qu'elle ait lieu à température ambiante ou inférieure.
- que la résolution du faisceau incident ne permettait pas de mettre en évidence d'orientation(s) privilégiée(s) du réseau de collagène selon les différentes zones anatomiques étudiées. En revanche très localement on observe l'orientation des fibres sur des zones analysées de l'ordre de quelques centaines de microns.
- que le tissu cicatriciel obtenu au cours de l'étude E1 présente peu de différences structurales à l'échelle des fibrilles de collagène, qu'il ait été obtenu après cicatrisation avec hydrogels ou Tulle Gras®.
- que la réponse de ce même tissu cicatriciel d'un point de vue structural n'est en revanche pas la même lors d'une sollicitation mécanique, confirmant l'hypothèse énoncée dans la première publication. Ceci pourrait traduire des différences à l'échelle suprafibrillaire, c'est-à-dire au niveau des faisceaux de fibres et des différences d'interactions entre fibres.

Cette première approche de l'étude structurale de la peau permettra d'optimiser de futures études des tissus cutanés, notamment de mieux dimensionner les échantillons à étudier, et également de concevoir des expériences complémentaires pour une caractérisation plus complète de l'orientation des fibres de collagène, en particulier les fibres de collagène se présentant avec une orientation hors du plan principal du derme.

Références bibliographiques

(chapitre 3)

- [1] S. Barany and A. Szepesszentgyorgyi, Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes, *Adv. Colloid Interface Sci*, 111 (2004) 117-129.
- [2] A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, X. Chevalier, M. T. Corvol, and A. Domard, A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering, *Biochimie*, 88 (2006) 551-564.
- [3] G. Chaussard, Elaboration et étude de matériaux innovants pour la reconstruction cellulaire., Université Claude Bernard Lyon 1, (2002).
- [4] S. Ladet, L. David, and A. Domard, Multi-membrane hydrogels, *Nature*, 452 (2008) 76-U6.
- [5] N. J. Fullwood and K. M. Meek, A Synchrotron X-Ray Study of the Changes Occurring in the Corneal Stroma During Processing for Electron-Microscopy (Vol 169, Pg 53, 1993), *Journal of Microscopy-Oxford*, 170 (1993) 190.
- [6] C. Merigoux, D. Durand, J. Doucet, M. Eugène, and O. Diat, Supramolecular organisation of collagen fibrils in human tissues, *ESRF Experiment Reports*, July (1997) 18-19.
- [7] S. Osaki, Distribution map of collagen fiber orientation in a whole calf skin, *Anatomical Record*, 254 (1999) 147-152.

Conclusion générale

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer de manière précise la qualité du tissu reconstruit en présence d'hydrogels physiques de chitosane après une brûlure du troisième degré. L'étude bibliographique, à travers les informations relatives à l'organisation du tissu cutané et aux différents types cellulaires qui le constituent, a permis d'établir un certain nombre de critères déterminant la qualité d'un tissu. Elle a également permis de confirmer l'intérêt du chitosane pour l'application visée.

Nadège Vizio-Boucard décrivait la formation d'un tissu cicatriciel qui semblait plus souple que celui obtenu lors de l'utilisation de Tulle Gras®. Les résultats des expériences menées dans le cadre du présent travail de thèse confirment que :

- Le dispositif est bien toléré par l'organisme hôte et qu'il génère peu ou pas de réaction inflammatoire cliniquement décelable.
- Le tissu régénéré avec les hydrogels de chitosane est fonctionnel et apte à jouer le rôle de barrière naturelle face à l'environnement extérieur.
- Les propriétés mécaniques du tissu régénéré avec les hydrogels bicouches sont plus proches de celles du tissu natif que ne le sont celles du tissu régénéré en présence de Tulle Gras®.

Par ailleurs l'étude structurale des tissus en microscopie électronique d'une part, et en diffusion des rayons X aux petits angles d'autre part, a montré que la cicatrisation aboutissait à un tissu dont l'organisation est sensiblement la même que celle du tissu sain. Nous avons pu mettre en évidence que les phénomènes de diffusion étaient tous attribuables au réseau de fibres de collagène et plus précisément à la périodicité inter ou intra-fibrillaire.

Il s'est avéré que les conditions de conservation des échantillons de peau n'influaient pas la qualité des résultats obtenus dans le cadre de ce type d'observation.

Les résultats obtenus au cours des essais de traction réalisés sous faisceau synchrotron ont montré que la réponse du tissu cicatriciel à une sollicitation mécanique n'est pas la même selon que le tissu a été obtenu à la suite de soin à base d'hydrogels ou de Tulle Gras®. Les hydrogels physiques de chitosane semblent en effet conduire à la formation d'un tissu dont la réponse élastique est supérieure, plus proche de celle du tissu natif.

Outre ces aspects, l'intérêt de ces dispositifs pour la cicatrisation thérapeutiques des brûlures réside dans leur caractère antibactérien. En effet l'étude bibliographique a montré que le risque de surinfection des plaies liées aux brûlures ne peut être négligé, et nous avons établi dans le cadre de ce travail que nos hydrogels ont une action bactériostatique vis-à-vis de différentes populations bactériennes.

Enfin le second objectif de ce travail était de mettre en évidence les mécanismes biologiques à l'origine de la bioactivité et du potentiel cicatrisant des hydrogels mis au point au laboratoire. Au cours de l'étude de la cicatrisation à long terme, nous avons observé que les matériaux implantés étaient envahis de cellules et de kératine. Ce résultat sans précédent a soulevé de nombreuses questions, notamment concernant les mécanismes cellulaires à l'origine de cette infiltration. En effet rappelons que la porosité intrinsèque des gels ne permet pas le passage des cellules, aussi nous avons envisagé une éventuelle dégradation du matériau via un mécanisme biologique.

Afin d'identifier ce mécanisme ainsi que la nature des cellules colonisatrices (inidentifiables dans les gels de la première expérimentation), une seconde étude a été mise en œuvre. Celle-ci a révélé un important chimiotactisme des hydrogels de chitosane vis-à-vis des polymorphonucléaires éosinophiles. Ces cellules peuvent être à l'origine de pathologies graves quand elles sont en surnombre, or dans notre cas elles semblent avoir focalisé leur action sur le chitosane et en aucun cas sur les tissus. Elles se fraient un chemin au niveau des microfissures apparues dans le gel du fait de sa déshydratation progressive et permettent l'invasion du gel par d'autres types cellulaires.

Ainsi nos hydrogels se transforment en matrices cellularisées dont l'aspect est celui d'une « ébauche de derme », parcouru par un réseau vasculaire néoformé. La limite matériau/tissu n'existe plus : les cellules pénètrent et se différencient dans l'hydrogel, tandis que ce dernier est en partie intégré dans le tissu en formation et persiste provisoirement dans le tissu, favorisant probablement le remodelage.

Il serait intéressant d'évaluer avec plus de précision le temps nécessaire à la complète résorption des fragments d'hydrogels résiduels, toutefois nous pouvons affirmer qu'après un an il n'en subsiste aucune trace dans le tissu cicatriciel.

L'étude approfondie du mécanisme de dégradation des hydrogels de chitosane par les éosinophiles semble nécessaire pour donner une description plus précise du mode d'action de nos dispositifs, toutefois nous pouvons d'ores et déjà considérer que les produits de cette dégradation jouent un rôle clef dans le mécanisme cicatriciel.

